1868

THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA
DAVIS

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Zweite Abteilung. 39. Band

CENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Zweite Abteilung:

Allgemeine, landwirtschaftlich-technologische Bakteriologie,
Gärungsphysiologie,
Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz

In Verbindung mit

Prof. Dr. Adametz in Wien, Geh. Reg.-Rat Dr. O. Appel, Biologische Anstalt zu Berlin-Dahlem, Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. J. Behrens, Direktor der biologischen Anstalt zu Berlin-Dahlem, Prof. Dr. M. W. Beijerinck in Delft, Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Delbrück in Berlin, Alb. Klöcker, extr. Vorsteher, Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen, Prof. Dr. Lindau in Berlin, Prof. Dr. Lindner in Berlin, Prof. Dr. F. Löhnis in Leipzig, Prof. Dr. Müller-Thurgau in Wädenswil, Prof. Dr. M. C. Potter, Durham College of Science, New-Castle-upon-Tyne, Prof. Dr. Samuel C. Prescott in Boston, Dr. Rommel in Berlin, Dr. Erwin F. Smith in Washington, D. C., U. S. A., Prof. Dr. Stutzer in Königsberg i. Pr., Prof. van Laer in Gand, Prof. Dr. C. Wehmer in Hannover, Prof. Dr. Weigmann in Kiel und Prof. Dr. Winogradsky in Petersburg

herausgegeben von

Geh. Reg.-Rat Prof. **Dr. Oscar Uhlworm**
in Berlin

39. Band

Mit 8 Tafeln und 102 Figuren im Texte

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1913—1914

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 1|3.
Ausgegeben am 27. September 1913.

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Kenntnis der sogenannten schwarzen Hefen.

[Mitteilungen der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München.]

Nach Untersuchungen von Fritz Noldin[1].

Von **H. Will.**

Mit 20 Figuren im Text.

Über die Morphologie und Physiologie der sogenannten schwarzen Hefen ist bis jetzt noch recht wenig bekannt[2]. Sämtliche Angaben stimmen jedoch darin überein, daß es sich um dunkelgefärbte Pilzzellen handelt, welche sich durch Sprossung vermehren. Daher leiten auch die verschiedenen Autoren die Berechtigung ab, jene Pilze entweder ganz allgemein als schwarze Hefe, oder, wenn sie glaubten Sporenbildung beobachtet zu haben, als Saccharomyces niger oder bei mangelnder Sporenbildung als Torula nigra zu bezeichnen.

Ob mit den Sproßzellen der Entwicklungskreis des Pilzes abgeschlossen ist, scheint entweder überhaupt nicht weiter untersucht worden zu sein, oder es findet sich darüber keine direkte Angabe vor. Nur in einem Bericht wird angeführt, daß neben den Sproßzellen auch Hyphen auftreten.

Sogenannte schwarze Hefen waren wohl schon früher bei Luftuntersuchungen gefunden worden. Der erste jedoch, welcher sich etwas eingehender mit einer in Kuhmilch gefundenen schwarzen Hefe beschäftigte, war G. Marpmann[3].

Die Zellen seiner Hefe waren kugelförmig bis oval, von 1,5 bis 3,0 μ Durchmesser und vermehrten sich durch Sprossung. Marpmann will auch Sporenbildung beobachtet haben. Nach seiner Angabe kommen 3—4 Sporen in einer Zelle vor. Er benennt deshalb auch seine schwarze Hefe Saccharomyces niger.

Marpmann erwähnt noch, daß öfter scheinbar Zellteilung auftritt. Er erklärt diese Erscheinung durch das Zusammenpressen zweier nach der Vermehrung zusammenhängender Zellen durch ihre Umgebung.

In Nährlösungen (Pasteurs Lösung mit Traubenzucker, Cohnscher Lösung mit Rohrzucker und Milchzuckerlösung) wächst der Pilz nach den Versuchen Marpmanns sehr langsam und bildet schwarze Sedimente. Gasentwicklung findet bei der Vermehrung nicht oder nur in sehr geringem Grade statt. Saccharose und Milchzucker werden nicht vergoren, dagegen Traubenzucker in sehr geringem Grade.

---

[1] Die Untersuchungen wurden im physiologischen Laboratorium der Wissenschaftlichen Station für Brauerei während des Jahres 1911/12 unter der Leitung des Referenten ausgeführt. In erweiterter Form sind sie von F. Noldin im Jahre 1912 als Dissertation an der Kgl. Technischen Hochschule in München eingereicht worden.

[2] Vgl. die Zusammenfassung im Handbuch der Technischen Mykologie von Franz Lafar. Bd. 4. p. 300.

[3] Marpmann, G., Centralbl. f. allgem. Gesundheitspfl. 1886. p. 422.

In Zuckernährlösungen wuchs der Pilz nicht zu Fäden aus. Ob dies in anderen Nährflüssigkeiten der Fall war und ob schon Marpmann Hyphenbildung beobachtet hatte, ist aus seinen sehr kurz gehaltenen Mitteilungen nicht ersichtlich. Wichtig ist in dieser Hinsicht seine Angabe, daß der Pilz auf Nährgelatine samtschwarze Rasen bildet. Da nach unseren später darzulegenden Beobachtungen die samtartige Beschaffenheit der Oberfläche einer Kultur durch Mycelbildung bedingt ist, kann aus Marpmanns Angabe mit Sicherheit geschlossen werden, daß seine Hefe auch Hyphen entwickelte.

Eine gewisse Bestätigung findet diese Schlußfolgerung durch die allerdings ebenfalls sehr kurzen Ausführungen von Emil Chr. Hansen[1]), welcher Untersuchungen an Originalmaterial von Marpmann anstellte. Er sagt: Das Hauptresultat der Untersuchungen war, daß die schwarze Hefe nicht einer Saccharomyces-, sondern einer Cladosporium- oder Fumago-Art angehört (also sich in den Entwicklungskreis eines Hyphomyceten einreiht). Unter gewissen Kulturbedingungen zeigten sich zwar in den Zellen kleine Körperchen, die Ähnlichkeit mit Sporen hatten, aber sie keimten nicht und hatten auch nicht den gewöhnlichen Bau der Sporen. Unter Einwirkung von Alkohol lösten sie sich außerdem. Die bisher untersuchten dunkel gefärbten Sproßpilze gehören zwar verschiedenen Arten an, stimmen aber alle darin überein, daß ihnen die oft besprochene Sporenbildung abgeht und daß sie nicht Gärung hervorrufen.

Deutlicher spricht sich P. Lindner[2]) aus: Im Kochschen Laboratorium wird ebenfalls eine „schwarze Hefe“ schon seit Jahren kultiviert. Dieselbe bildet in jüngeren Kulturen auf dem Impfstrich ein schwarzes Polster aus Sproßzellen. Später entwickelt sich auf diesem Polster ein dunkelgrüner Rasen aus lauter Hyphen bestehend. Außerordentlich charakteristisch ist das Wachstum im Impfstich in Gelatineröhrchen. Schon nach wenigen Tagen sieht man denselben von einer Menge strahlenförmiger Verzweigungen umgeben, die sich allmählich verbreitern und bei zunehmendem Alter schwarz färben. In älteren Kulturen bekommen wir das Bild eines reich verzweigten Baumes, der gewissermaßen auf der Spitze steht und dessen Wurzeln in der Oberfläche der Gelatine zu suchen wären. Bei Kulturen in Bierwürze bilden sich auf der Oberfläche kleine Mycelien, in deren Mitte ein aus Sproßzellen bestehender breiiger Kuchen heranwächst. Ähnliche Mycelien bilden sich auch vielfach unmittelbar ober- und unterhalb der Flüssigkeit an der Glaswandung.

Guilliermond[3]) gibt von der Torula nigra (Marpmann) folgendes an:

Le Torula nigra végète abondamment sur carotte. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, la carotte est envahie par une masse gluante d'un vert noirâtre, qui est composée exclusivement de formes levures ovales où légèrement allongées. Quelques jours après, on voit naître dans les parties les moins humides de la carotte un mycélium très grêle, qui surgit de la masse noire des levures et se détache en un feutrage gris. . . . .

Ces levures sont agglomerées dans un mucus, qui prend une coloration rougeâtre avec l'hémalun et contient quelques particules solides noirâtres, aux quelles est due sans doute la couleur noire de la culture. . . . .

---

[1]) Hansen, Emil Chr., Allgem. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 27. 1887. p. 1109.

[2]) Lindner, P., Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 4. 1887. p. 853.

[3]) Guilliermond, A., Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. Lyon 1902. p. 211.

On observe dans les cultures âgées des formes levures qui s'allongent, se multiplient sans se séparer complètement, formant ainsi des articles capables d'émettre les bourgeons latéraux, et qui ressemblent aux voiles des levures et particulièrement aux formes mycéliennes de l'E. albicans et du M. candida. Ces articles possèdent une structure analogue à cettes des formes levures et il n'existe le plus souvent qu'un seul noyau par cellule. Mais à côté de cela se trouve un véritable mycélium analogue à celui de Dematium, à articles très longs avec des bourgeonnements latéraux et des ramifications . . . . .

Ce champignon se rattache donc très probablement aux Dématiées.

P. Lindner[1]) erwähnt noch ein von Zeidler in Moskau isolierte schwarze Hefe, welche von derjenigen des Kochschen Laboratoriums verschieden war. Sie bestand aus elliptischen Zellen von ca. 6 μ Längendurchmesser. Auf Würzegelatine wuchs sie im Gegensatz zu derjenigen des Kochschen Laboratoriums mit feuchter, gekröseartig gefalteter Oberfläche, auf der später nur eine spärliche Wolle sich entwickelte. In der Tröpfchenkultur erschienen fädige Elemente nicht.

Hingewiesen sei noch auf die Angabe von B. H. Buxton[2]), nach welcher Saccharomyces niger nur Maltase und Invertase, nicht aber Diastase, Laktase und Inulase enthielt.

Systematische Untersuchungen an sogenannten schwarzen Hefen sind also bisher noch nicht durchgeführt worden. Ich veranlaßte daher Herrn Fritz Noldin an einigen Kulturen verschiedenen Ursprungs vergleichende Untersuchungen nach den für die Unterscheidung der Sproßpilze zurzeit gültigen Richtpunkten durchzuführen.

Ein besonderes Augenmerk wurde bei allen Versuchen auf die Entwicklung eines Mycels gerichtet.

Die Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf drei Organismen, bezeichnet als Form I, II und III, die uns in zuvorkommendster Weise von folgenden Instituten aus ihrem Sammlungsbestand zur Verfügung gestellt wurden, wofür ich an dieser Stelle meinen wärmsten Dank zum Ausdruck bringen möchte.

Form I. Hefereinzuchtstation zu Geisenheim a. Rh., als Saccharomyces niger bezeichnet.

Form II. Hygienisch-bakteriologisches Institut der K. Universität Erlangen.

Form III. K. Hygienisches Institut der Universität Königsberg in Preußen.

Das Aussaatmaterial bei den einzelnen Versuchen entstammte 8—12 Tage alten Kulturen in gehopfter Bierwürze und bestand vorherrschend aus Sproßzellen.

Folgende Nährböden wurden verwendet[3]): a) Flüssige: 1. Ungehopfte und gehopfte Bierwürze von 11—12° B., 2. Kartoffelwasser, 3. Gelbrübenwasser, 4. Weißkrautwasser, 5. Milch, entrahmt, 6. Hefenwasser,

---

[1]) Lindner, P., Mikroskop. Betriebskontrolle. 5. Aufl. p. 841.

[2]) Buxton, B. H., Amer. Med. Vol. 5. 1903. p. 137; Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 21. 1904. p. 722.

[3]) Will, H., Anleitung zur biologischen Untersuchung usw. München 1909. Anhang. p. 445 ff.

7. Mineralische Nährlösung nach Hayduck von folgender Zusammensetzung: 25 g KH_2PO_4, 8,5 g $MgSO_4$, 5 g Zucker, 20 g Pepton Witte, in 1 l Wasser gelöst. b) Feste: 1. Würzegelatine aus ungehopfter und gehopfter Bierwürze (10-proz.), 2. Kartoffelwassergelatine (10-proz.), 3. Gelbrübenwassergelatine (10-proz.), 4. Weißkrautwassergelatine (10-proz.), 5. Kartoffel, 6. Gelbrüben (5 und 6 in keilförmigen Stücken in Reagensröhren).

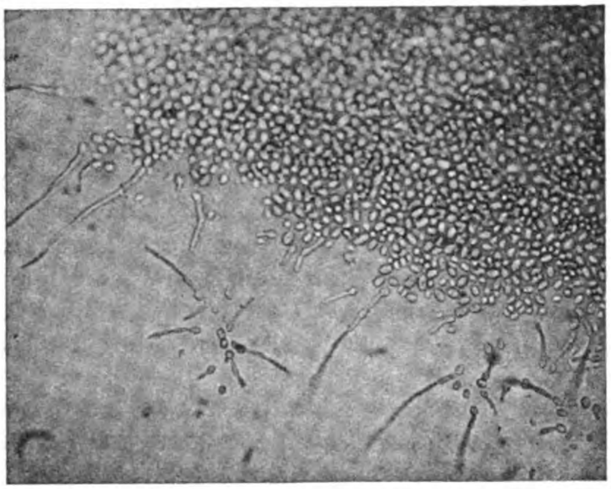


Fig. 1. Form I. Zu Hyphen auswachsende Sproßzellen. 8 Tage alte Tröpfchenkultur auf Böttcherscher feuchter Kammer. 300 : 1.

Allgemeine Morphologie. Die drei untersuchten Formen sind Hyphomyceten mit Konidienbildung. In den Kulturen tritt einerseits ein typisches Mycel und andererseits ein Sproßmycel auf, dessen Glieder sich teilweise sehr bald trennen, teilweise in Zusammenhang bleiben.

Je nach den Kulturbedingungen herrschen die Sproßzellen oder das Mycel vor. Bei Einsaat von Konidien oder Sproßzellen vermehren sich diese anfangs durch Sprossung. Nach einer gewissen Zeit, meist nach 3—4 Tagen, beginnt die Entwicklung der Hyphen (Fig. 1). Die anfangs gedrungenen Sproßzellen gehen zunächst in langgestreckte Formen über, die einander meist mit breiter Basis aufsitzen. Bei weiterem Wachstum gehen diese allmählich in einen in kurzen Abständen durch Querwände geteilten Schlauch über. Später werden die Querwände der Hyphen seltener und dünner, so daß sie oft nur mehr schwer zu erkennen sind.

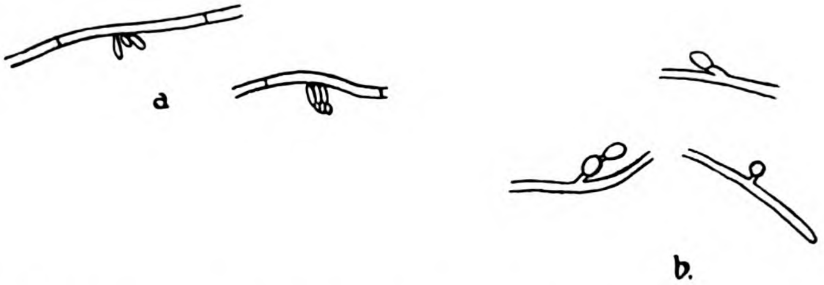


Fig. 2. Form I. a) Hyphen mit Konidien; b) auf kurzem Seitenast der Hyphe sitzende Konidien. Luftmycel von Riesenkolonien auf Würzegelatine. 500 : 1.

Das Mycel verzweigt sich und erzeugt kugelförmige oder ellipsoidische Konidien (Fig. 2—5). Diese sitzen entweder direkt dem Mycelfaden oder kurzen Ausstülpungen aus diesen auf. Die Konidien erzeugen an Ort und

Stelle entweder Sproßzellen oder sie wachsen unmittelbar wieder zu Hyphen aus (Fig. 6).

Die Zellwand der Sproßzellen und der Hyphen ist nach außen scharf begrenzt und sehr oft, besonders bei Zellen älterer Kulturen, verdickt und dunkelgrün gefärbt. Die Zellen mit verdickter Membran sind als Gemmen aufzufassen.

Die beiden Elemente, Sproßkonidien und typisches Mycel, setzen die Pilzrasen, die in den verschiedenen Kulturen als Ringbildung, Hautinseln, Riesenkolonien, Absätze usw. auftreten, zusammen und verleihen diesen, je nachdem das eine oder das andere Element vorherrscht, bei den einzelnen untersuchten Pilzformen ein besonderes Gepräge. Hierüber geben die Ausführungen über die Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit und der Riesenkolonien Aufschluß.

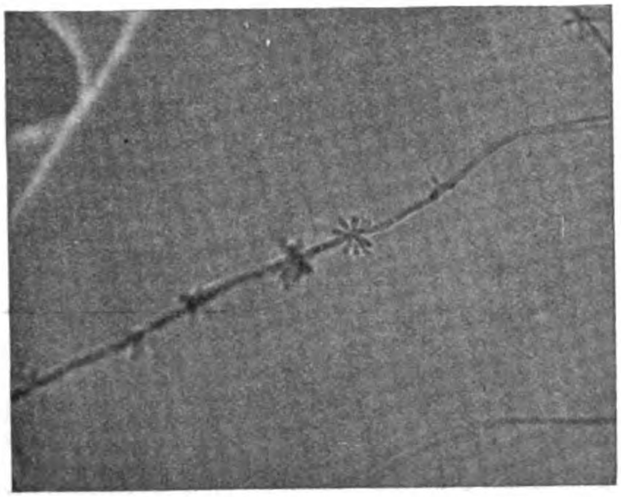


Fig. 3. Form I. Hyphe mit Konidien. 14 Tage alte Tröpfchenkultur auf Böttcherscher feuchter Kammer. 450 : 1.

Spezielle Morphologie. Form I. Die Form der meist isolierten Sproßzellen ist im allgemeinen gestreckt-ellipsoidisch (Fig. 7). Außerdem finden sich unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen noch verschiedene andere Formen, wie runde, langgestreckte, wurstförmige, keulenförmige und ganz unregelmäßig gestaltete. Nicht selten zeigen die Zellen sogar Zuspitzung wie bei den Apiculatusformen an einem der Pole. In zitronensäurehaltiger mineralischer Närhlösung fast ausschließlich wurstförmige Zellen mit je einem stark lichtbrechenden Körperchen an jedem Pole; sind Mycodermazellen sehr ähnlich. In milchsäurehaltiger Nährlösung und in Milch an einem Pole einer Mutterzelle mehrere (5—6) Tochterzellen wie bei Kronenbildung. — Hauptmasse des Zellinhaltes blaß; häufig sehr stark lichtbrechende Körperchen,

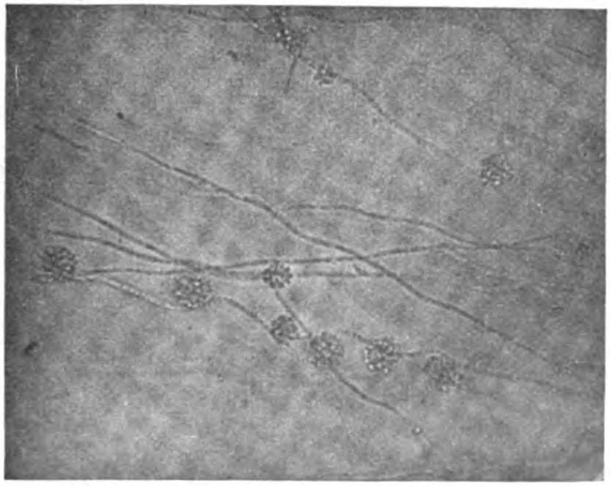


Fig. 4. Form II. Hyphen mit Konidien. 6 Wochen alte Tröpfchenkultur nach Wichmann-Zikes (Tröpfchenplattenverfahren). 400 : 1.

die in bezug auf Größe, Anzahl und Lagerung in der Zelle keine Regelmäßigkeit erkennen lassen. — Gemmenbildung häufig. — Farbe der einzelnen Zellen rauchgrau, dichtere Gruppen olivgrün bis dunkelgrün. — Die Größe der Sproßzellen ist je nach ihrer Gestalt sehr verschieden.

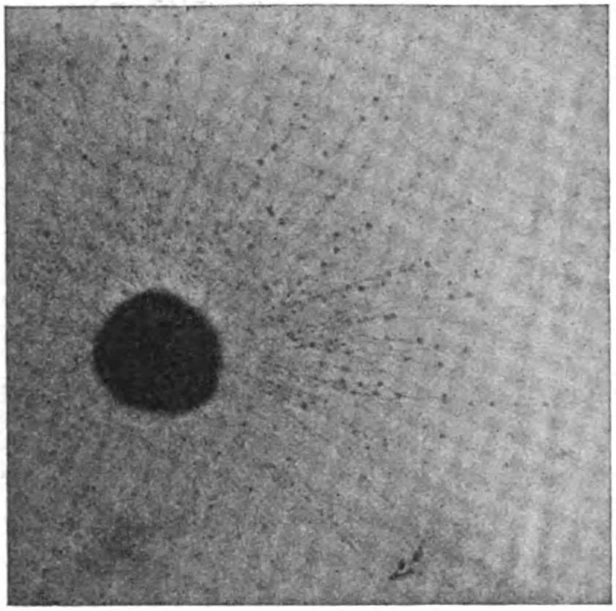


Fig. 5. Form II. Pilzkolonie, 6 Wochen alt, angelegt nach Wichmann-Zikes. 70 : 1.

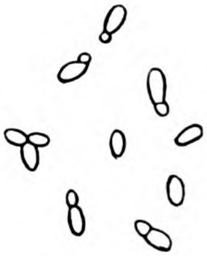


Fig. 7. Form I. Sprossende Zellen in gehopfter Würze. 40 Stunden alte Tröpfchenkultur bei Zimmertemperatur. 500 : 1.

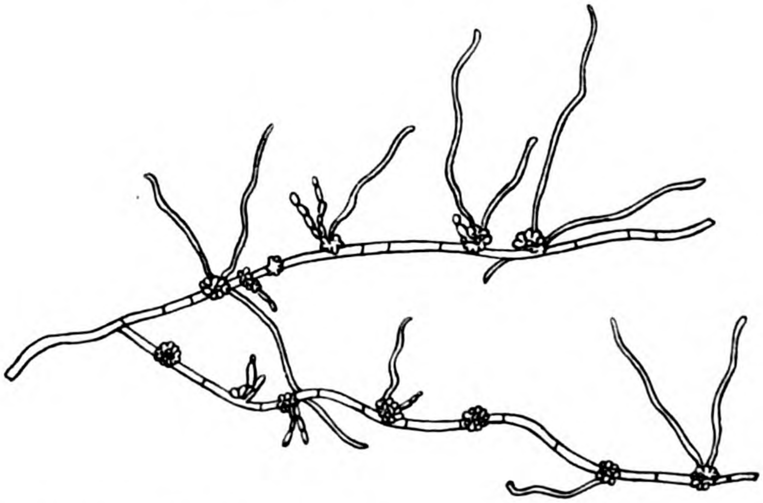


Fig. 6. Form II. Mycel mit Gruppen von Konidien, die teilweise zu Hyphen ausgewachsen sind. Tröpfchenplattenkulturen nach Wichmann-Zikes mit Würzegelatine. 500 : 1.

Folgende Zahlen sind Durchschnittswerte aus 24 Messungen: 1. gestreckt-ellipsoidische 8,45 : 3,89 μ, 2. langgestreckte 13,58 : 2,65 μ.

Die Hyphen, die fast in allen Kulturen vorkommen, sind 1,4—1,6 μ breit, schwach lichtbrechend. Zellinhalt in jüngeren Kulturen homogen, in älteren granuliert. Wandverdickung tritt auch beim Mycel auf.

Form II. Sproßzellen eiförmig. Die Sproßzellen bleiben lange im Verband und bilden Ketten, deren Glieder einander mit breiter Basis aufsitzen und durch eine zarte Scheidewand getrennt sind (Fig. 8).

Zellinhalt und Zellhaut übereinstimmend mit Form I. Gemmenbildung.

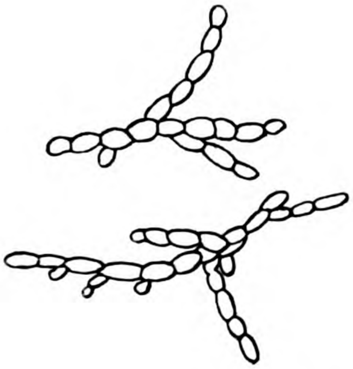


Fig. 8. Form II. Sprossende Zellen in gehopfter Würze. 40 Stunden alte Tröpfchenkultur bei Zimmertemperatur. 500 : 1.

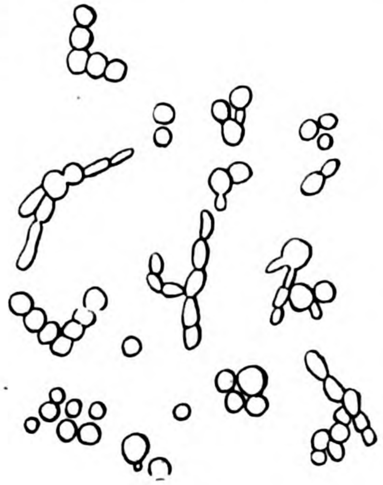


Fig. 9. Form III. Sprossende Zellen in gehopfter Würze. 40 Stunden alte Tröpfchenkultur bei Zimmertemperatur. 500 : 1.

Im Vergleich zu Form I ist das Bild der Sproßzellen nicht so einheitlich; Abweichungen von der Grundform sind häufiger, und zwar kommen vor: kugelförmige, wurstförmige und unregelmäßig gestaltete Zellen. Ihre Größe ist nach dem Durchschnittswert von 24 Messungen folgende: 1. kugelförmige Zellen 5,15 μ, 2. langgestreckte 12,0 : 2,9 μ, 3. eiförmige 7,6 : 3,97 μ.

Die Hyphen verhalten sich in bezug auf Größe und Beschaffenheit des Zellinhaltes wie bei Form I. In einzelnen Fällen zeigten sie geringfügige Abweichungen.

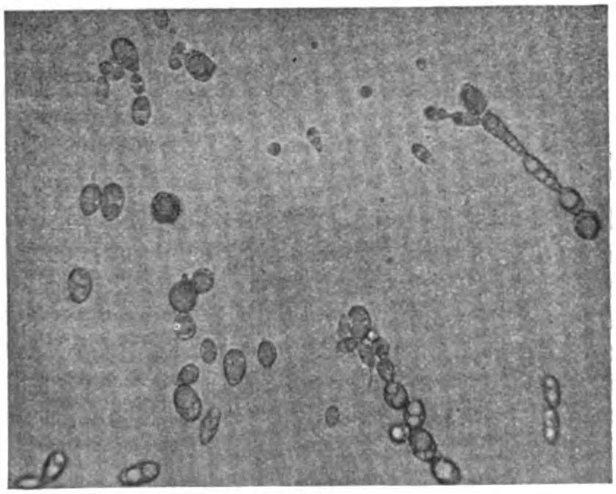


Fig. 10. Form III. Sproßzellen mit sporenähnlichen Fettröpfchen aus dem Pilzring einer 2 Monate alten Würzekultur. 450 : 1.

Form III. Sproßzellen vorherrschend kugelförmig. Variationen: gestreckt-ellipsoidisch, ei- und wurstförmig (Fig. 9). — Zellinhalt etwas stärker lichtbrechend als bei den beiden anderen Formen; sehr häufig mit kleinen, gewöhnlich unregelmäßig verteilten Fettröpfchen in wechselnder Zahl. In älteren Würzekulturen Fettröpfchen größer und ähnlich wie Sporen in Zellen von Saccharomyceten gelagert (Fig. 10). Durchmesser: kugelförmige Zellen

4,5 μ, ovale 5,9 : 3,7 μ. In Milch kugelförmige Riesenzellen häufig. — Zellhaut nicht verschieden. — Mycelbildung nicht so üppig wie bei den beiden anderen Formen; sie tritt den Sproßzellen gegenüber zurück. Mycelwand häufig verdickt und dunkelgrün gefärbt.

Sporenbildung. Nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen findet in Sproßkonidien endogene Sporenbildung wie bei den Saccharomyceten nicht statt. Da aber Marpmann in seiner schwarzen Hefe Sporen beobachtet haben wollte, wurde durch eine Reihe von Versuchen eingehend geprüft, ob nicht doch durch geeignete Heranzüchtung und Behandlung der Sproßzellen in diesen Sporenbildung hervorgerufen werden kann. Die Versuche wurden in der Weise variiert, daß einmal die Kulturen in verschiedenen Nährflüssigkeiten wie gehopfter Würze + Dextrose, ungehopfter Würze, Kartoffelwasser usw. herangezüchtet wurden. Zweitens wurden die Gipsblöcke nach der Angabe von Zikes[1]) außer mit gewöhnlichem Wasser auch noch mit Gipswasser und mit den erwähnten Nährflüssigkeiten getränkt. Drittens wurde das in verschiedener Weise herangezüchtete Aussaatmaterial auch auf Karotten und Kartoffeln aufgetragen. Alle diese Verfahren, die geeignet sind, bei den Saccharomyceten Sporenbildung zu veranlassen, blieben erfolglos. In dem von Marpmann angeführten Falle scheint es sich also, wie schon Hansen ausgesprochen hat, nicht um Sporen gehandelt zu haben, sondern um Fetttröpfchen, die auch im Verlauf dieser Untersuchungen sehr häufig in einer mit Sporen leicht zu verwechselnden Form und Anordnung in den Sproßzellen auftraten (vgl. Fig. 10). Ihr Aussehen war verschieden von Hefesporen. Mit Osmiumsäure gaben die stark lichtbrechenden, sporenähnlichen Gebilde die bekannte Reaktion, bei Alkoholbehandlung lösten sie sich auf. Nach Aussaat der die fraglichen Körperchen enthaltenden Zellen in Nährlösungen zeigten jene unter den sonst für die Sporenkeimung günstigen Bedingungen keine irgendwie geartete Erscheinung, welche zu dem Schluß hätte führen können, die sporenähnlichen, stark lichtbrechenden Körperchen als endogene Sporen anzusprechen.

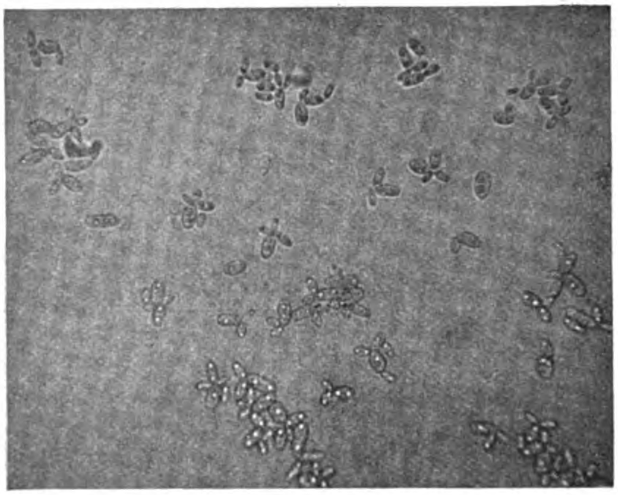


Fig. 11. Form I. Sproßzellen mit Fetttröpfchen, Kreuzbildung. 14 Tage alte Tröpfchenkultur. 450 : 1.

Wachstumserscheinungen in und auf verschiedenen Nährböden. 1. Flüssige. a) Tröpfchenkulturen mit gehopfter Bierwürze. Hohlgeschliffener Objektträger. Zimmertemperatur.

Form I. Vermehrung ausschließlich durch Sprossung. Selbst in mehrere Wochen alten Kulturen keine Mycelbildung. Die Tochterzelle sitzt an einem der beiden Pole der Mutterzelle und wächst in der Richtung von deren Längsachse fort (Fig. 7). Zuweilen ist die Tochterzelle der Mutterzelle etwas seitlich angesetzt. Die Tochterzellen lösen sich in der Regel bald ab und liegen dann im Tröpfchen zerstreut umher. Zuweilen findet sich auch Parallellagerung wie bei Mycoderma. Ab und zu bleiben die Zellen längere Zeit im Verband und bilden 4—5-gliedrige, unverzweigte Reihen oder es sind 3—4 an der Mutterzelle kreuzförmig angeordnet (Fig. 11).

---

[1]) Zikes, H., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. p. 145.

Innerhalb zwei Tagen hatte starke Vermehrung stattgefunden. Die Zellen lagen auf einem dichten, grünlich gefärbten Haufen, dessen Peripherie mehr oder weniger gelockert erschien. Am äußersten Rand des Haufens lagen die Zellen vereinzelt. Riesenzellen, oval oder kugelförmig.

Form II. Vermehrung ebenfalls nur durch Sprossung, die Zellen bleiben jedoch lange Zeit im Verbande, es entstehen Reihen von Zellen, die sich später verzweigen (Fig. 8). Die Zweige strahlen entweder unregelmäßig nach allen Richtungen hin aus oder zeigen häufiger, besonders nach kräftiger Vorernährung mehr oder weniger regelmäßige, sternartige Anordnung. Die Tochterzelle sitzt einem Pole der Mutterzelle auf und wächst entweder in der Richtung der Längsachse der Mutterzelle oder sehr häufig in einem Winkel von ungefähr 45° zu jener weiter, was das strahlenförmige, sparrige Aussehen der jungen Kolonie bedingt. Von der dicht geschlossenen Kolonie lösen sich nur kleinere Zellverbände und einzelne Zellen los.

Form III. Vermehrung ebenfalls durch Sprossung. Keine Mycelbildung. Die Sproßzellen lösen sich wie bei Form I bald aus dem Verbande los. Ausnahmsweise Sproßverbände von 4—6—8 Gliedern (Fig. 9). Zellenreihen gerade und in der Regel unverzweigt. Nur in einzelnen Fällen fand eine Sprossung rechtwinkelig zu der anfänglichen Richtung statt. — In einigen Tröpfchen Riesenzellen.

Zwischen den drei Formen bestehen also in den Tröpfchenkulturen auf dem hohlgeschliffenen Objektträger geringe, aber konstante Unterschiede hauptsächlich in der Richtung, daß die Sproßgenerationen entweder in fest zusammenhängenden Sproßmycelien, die sich verzweigen, vereinigt bleiben oder sich bald voneinander trennen. Spätere Versuche zeigten, daß sich auch im Würzetröpfchen Hyphen entwickeln, wenn statt der hohlgeschliffenen Objektträger Böttchersche Kammern verwendet werden, welche mehr Feuchtigkeit als die hohlgeschliffenen Objektträger umschließen[1]).

b) Adhäsionskultur[2]) mit gehopfter Bierwürze. Hohlgeschliffener Objektträger. Zimmertemperatur. Beobachtungsdauer 2 Wochen.

Form I. Die Sprossung vollzog sich in ganz ähnlicher Weise wie in der Tröpfchenkultur, die Zellen zeigten jedoch fast durchweg apiculatusähnliche Zuspitzung. Auffallend war außerdem das Auftreten von langgestreckten Zellen, die aber nicht zur Hyphenbildung überleiteten.

Form II. Auch hier traten zu Beginn der Vermehrung dieselben Erscheinungen wie in der Tröpfchenkultur auf. Nach einigen Tagen entwickelten sich aber in vereinzelten Fällen aus den gedrungenen ovalen Sproßkonidien auch langgestreckte Zellen, die dann in Hyphen übergingen, eine Erscheinung, die in Tröpfchenkulturen nicht beobachtet wurde.

Form III. Die durch Sprossung entstandenen Zellen unterschieden sich von denjenigen in den Tröpfchenkulturen nur durch die häufig auftretende Zuspitzung. Langgestreckte Zellformen oder Hyphen wurden im Gegensatz zu Form I und II nicht beobachtet.

---

[1]) Die Ursache, welche die Sproßkonidien allmählich zur Mycelbildung überleitet, ist noch zu erforschen. Einige dahin zielende Versuche brachten bis jetzt keine Entscheidung.

[2]) Lindner, P., Mikroskop. Betriebskontrolle. 5. Aufl. p. 247.

Die Beobachtungen an den Adhäsionskulturen, welche zur Bestimmung der Generationsdauer der Sproßkonidien (s. später) angelegt wurden, ergaben im allgemeinen Übereinstimmung mit jenen in den Tröpfchenkulturen. Ein wesentlicher Unterschied machte sich nur bei Form II wieder in der Richtung geltend, als auch hier ein Mycel zur Ausbildung gelangte.

Die in den Adhäsionskulturen beobachtete apiculatusähnliche Zuspitzung der Zellen kann, trotzdem sie in jenen häufig auftritt, nicht als für die Adhäsionskultur charakteristisch bezeichnet werden.

c) Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit. Die Beobachtungen wurden an Kulturen in folgenden Nährflüssigkeiten, von welchen ein Teil noch zur Lösung besonderer Fragen diente, angestellt: Gehopfte und ungehopfte Bierwürze, Kartoffelwasser, Gelbrübenwasser, Krautwasser, Milch, Hefenwasser, gehopfte Bierwürze mit Zusatz von Äthylalkohol, Hayducks Nährlösung mit Zusatz von Pepton und verschiedenen Säuren, Hayducks Nährlösung mit verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. Diese Nährflüssigkeiten wurden in Mengen von je 50 ccm auf Erlenmeyer-Kölbchen abgefüllt, sterilisiert und nach mehreren Tagen geimpft. Die Kulturen blieben bei Zimmertemperatur stehen.

In allen Kulturen ging die Entwicklung der drei Pilzformen im allgemeinen in gleicher Weise von statten, sie erfuhr nur gewisse Änderungen insofern, als besonders das letzte Entwicklungsstadium (Entwicklung einer Oberflächenvegetation) in den verschiedenen Nährlösungen mehr oder minder scharf ausgeprägt erschien.

Als Vorboten einer äußerlich sichtbaren Vegetation treten meist ganz kleine Pilzkolonien entweder an der Wand des Gefäßes haftend oder in der Flüssigkeit schwimmend auf. Anschließend an jene kommt es zur Entwicklung eines Bodensatzes, der entweder schlammartig oder flockig ist, je nachdem er aus Sproßzellen oder aus Mycel besteht.

In ein neues Stadium der Entwicklung treten die Kulturen in der Regel nach 12 oder 14 Tagen mit dem Erscheinen einer Oberflächenvegetation. Am Rand des Flüssigkeitsspiegels siedelt sich eine Reihe von kleinen Pilzrasen an, die sich späterhin ausdehnen, bis sie sich gegenseitig berühren und durch Verfilzung einen mehr oder weniger stark ausgebildeten Ring bilden. Der Ring, der eine Breite von 5—10 mm erreichen kann, hat in sich einen so festen Zusammenhalt, daß er wie ein Band von der Wand des Gefäßes losgelöst werden kann. Er ist von weich-knorpeliger Beschaffenheit und läßt zwei verschiedene Zonen erkennen: eine obere dunkel gefärbte oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche und eine untere helle, die sich in der Flüssigkeit befindet. Die dunkle Farbe jener ist durch die intensiv grünliche Färbung der stark verdickten Wandung der Sproßzellen und des Mycels bedingt. Die starke Verdickung des Mycels scheint bei direkter Berührung mit Luft zustande zu kommen.

Die Ringbildung ist in geeigneten Nährlösungen meist von einer Hautbildung begleitet. Bei dieser erscheinen zuerst ganz kleine, kaum wahrnehmbare Pilzinseln von tiefschwarzer Farbe und lackartigem Glanze. Im weiteren Verlauf der Entwicklung verhalten sich jene in bezug auf Formgestaltung in den einzelnen Nährlösungen verschieden. Am häufigsten stellen die kleinen Pilzrasen eine an der Oberseite konvex gewölbte, glatte Scheibe dar, die einen Durchmesser von 6 mm erreicht. Der Unterseite dieser festeren und dichteren Pilzinseln hängen lockere Mycelfäden derart an, daß die Pilzrasen, von der Seite betrachtet, fast kugelförmig erscheinen.

Diese Wachstumsform findet sich in den meisten Nährflüssigkeiten. Eine geringe Abweichung von diesem Typus kam in der Hayduckschen Nährlösung mit verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen vor. Hier entstanden auf der Oberfläche der kleinen Pilzrasen von Form II und III Zotten in Form von einzelnen stachelartigen Erhebungen.

Ähnlich wie bei Entstehung des Ringes tritt auch bei der Hautbildung eine Verschmelzung und Verfilzung der kleinen Pilzrasen ein, wodurch eine geschlossene Haut entsteht, welche die Flüssigkeitsoberfläche überzieht und meist mit dem Ring in Zusammenhang tritt.

Die Haut besteht aus einem Flechtwerk von Hyphen, in das Sproßzellen eingelagert sind. Welches dieser beiden Elemente in den Vordergrund tritt, hängt von der Zusammensetzung der Nährlösung ab. Das Hervortreten des einen oder des anderen Elementes bedingt eine gewisse Modifikation in der Beschaffenheit, im Aussehen und in der Färbung der Oberflächenvegetation. Herrschen Sproßzellen vor, so ist die Festigkeit der Haut gering, ihre Oberfläche ist glatt oder fein gekörnt, schwarz gefärbt und lackartig glänzend. Herrscht dagegen das Mycel vor, so ist die Oberfläche der mehr oder weniger knorpeligen, dicken Haut durch Luftmycel wollig, grau bis dunkelgrün gefärbt. Stark entwickelte Oberflächenvegetationen sind grob gefaltet.

Das Aussehen, die Beschaffenheit und die Färbung der Oberflächenvegetation kann bei der gleichen Pilzform in der gleichen Nährlösung je nach dem Hervortreten des einen oder des anderen Zellelementes im Laufe der Entwicklung wechseln.

Die verwendeten Nährlösungen erwiesen sich für die Entwicklung der drei Pilzformen nicht gleichwertig. Würze und einzelne Pflanzensäfte eignen sich für ihre Kultur sehr gut, Milch, Hefenwasser und mineralische Nährlösungen dagegen etwas weniger. Nach den Wachstumserscheinungen in den einzelnen Kulturen können die Nährflüssigkeiten in zwei Gruppen geteilt werden.

Die erste umfaßt: Würze[1]), Pflanzensäfte, Milch und Hefenwasser, die zweite: mineralische Nährlösungen mit verschiedenen Zusätzen.

Für die erste Gruppe ist ein aus Sproßzellen bestehender Bodensatz und eine kräftige Oberflächenvegetation, die in günstigen Nährlösungen wie Würze, Gelbrübenwasser, in Form einer völlig geschlossenen Haut ihren Höhepunkt erreicht, charakteristisch.

Anders die zweite Gruppe: Oberflächenvegetation fehlt entweder ganz oder die Pilzinseln, die mitunter sehr kräftig entwickelt sind, treten niemals miteinander in Verbindung, sondern sinken in der Regel selbst bei leichter Erschütterung der Kultur zu Boden. Der Bodensatz besteht aus flockigem, voluminösem Mycel.

Die Zusammensetzung der Nährlösung bedingt eine verschiedene Färbung der Organismen. In Würze bei Tageslicht und im Dunkeln, sowie bei verschiedenen Temperaturen sind sie dunkelgrün, in Krautwasser blaßgrün, in Milch und in Hefenwasser bei höherer Temperatur braun gefärbt; bei niederer Temperatur erscheinen sie in Hefenwasser farblos.

---

[1]) Zwischen gehopfter und ungehopfter Würze besteht kein wesentlicher Unterschied; es wurde deshalb auch in den meisten Fällen die leichter beschaffbare gehopfte Würze zu den Versuchen benutzt.

Für die Unterscheidung der einzelnen Pilzformen bieten die äußeren Wachstumserscheinungen in den verschiedenen Nährflüssigkeiten nur verhältnismäßig geringe Anhaltspunkte. Deshalb wurde eine Wiedergabe der Einzelbeobachtungen, welche in der Dissertation des Herrn Noldin zusammengestellt sind, unterlassen.

Der konstanteste Unterschied zwischen den drei Pilzformen in sämtlichen Nährlösungen besteht in der Form der Sproßzellen. Ähnlich wie in den Tröpfchenkulturen sind jene bei Form I immer gestreckt-ellipsoidisch und isoliert, bei Form II meist eiförmig und in langen Verbänden vereinigt, bei Form III kugelförmig und, abgesehen von vereinzelten Verbänden, voneinander getrennt.

Für Form III ist das Auftreten von kugelförmigen Riesenzellen mit großen Vakuolen in Milch und Hefenwasser charakteristisch.

Bemerkt sei noch, daß Milch durch das Wachstum der drei Pilzformen nur verhältnismäßig geringe Veränderungen erfuhr, jedenfalls trat keine Gerinnung ein. Am Boden der Kulturkölbchen entstand ein schwacher weißer Absatz; die Flüssigkeit erschien nicht mehr rein weiß, sondern zeigte einen Stich nach Grau. Sie war durchscheinend.

2. Feste Nährböden. a) Einzellkulturen. Die Kulturen wurden nach dem von Wichmann und Zikes[1]) angegebenen Tröpfchenplattenverfahren angefertigt. Auf ein geteiltes Deckglas wird eine dünne Schicht verflüssigter Nährgelatine aufgetragen und auf dieser nach dem Erstarren mittels einer Kapillarröhre eine Tröpfchenkultur angelegt. Benutzt wurde Würzegelatine. Zimmertemperatur.

Form I. Die Sprossung vollzieht sich in der gleichen Weise wie in der Tröpfchenkultur. Die Zellen lösen sich zunächst aus dem Verbande, liegen einzeln, häufen sich dann zu Kolonien vom Typus I[2]).

Hyphen entwickeln sich erst nach 6—8 Wochen; sie werden nur selten beobachtet. Einen Einfluß auf die Formgestaltung der Kolonien üben jene nicht aus. An den Hyphen entstehen wie in den Tröpfchenkulturen Konidien, meist 2—4 nebeneinander. Größere Ansammlungen von Konidien traten an den Hyphen nicht auf.

Form II. Die Sprossung der eingesäten Konidien erfolgt in Reihen mit seitlichen Abzweigungen. Diese sind wie in den Tröpfchenkulturen in einem Winkel von ungefähr 60° der Ausgangszelle seitlich angesetzt. In einem späteren Stadium stellen die Kolonien einen im allgemeinen runden Zellhaufen dar, von welchem nach allen Seiten hin einreihige Sproßverbände ausstrahlen. Anfangs Typus I, später Typus II.

Während in der ersten Zeit ausschließlich Sproßzellen entstanden, kam es im zweiten Monat auch zur Entwicklung von Hyphen, die von dem mehr oder weniger kreisförmigen Kern der im übrigen unregelmäßigen Kolonie in radialer Richtung weit über den Rand des Kernes der Kolonie ausstrahlten.

In gewissen Abständen erzeugten die Hyphen mehr oder weniger halbkugelförmige oder sternförmige Anhäufungen von Konidien, aus welchen nicht selten unmittelbar wieder Hyphen hervorwuchsen (Fig. 4, 5 u. 6).

Form III. Anfangs kleine Sproßverbände von runden Zellen, aus wel-

---

[1]) Wichmann, H. u. Zikes, H., Allg. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabrik. Bd. 33. 1905. p. 1.

[2]) Will, H., Anleitung usw. p. 83.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

chen sich dann unregelmäßige Zellhaufen entwickeln, deren Form zwischen Typus I und II liegt. Die Kolonien bestehen aus einem dichteren Kern mit unregelmäßiger Randlinie. Die meisten Kolonien, besonders aber die am Rande der Gelatine gelegenen, erzeugen Hyphen, die in radialer Richtung weit über den dichteren Kern hinauswachsen. Die Verteilung der Hyphen ist keine regelmäßige, sondern die dem Rand der Gelatine nahe gelegenen Kolonien erzeugen, besonders an der der Peripherie der Gelatineschicht zugekehrten Seite anffallend viele Hyphen. Auch hier tragen diese in nicht sehr großen Abständen Gruppen von fast immer sternförmig angeordneten Konidien, die häufig gleich wieder zu Hyphen auswachsen. Es bietet sich also bei der vorliegenden Form das gleiche Bild wie bei Form II.

Bei der Einzellkultur auf festen Nährböden wiederholen sich also bei den einzelnen Organismen die Bilder, die wir bereits bei der Tröpfchenkultur kennen gelernt haben. Die in jedem einzelnen Falle beobachteten Erscheinungen erhalten aber dadurch das Gepräge von unterscheidenden Merkmalen:

Form I: Sofortige Trennung von Tochter- und Mutterzelle.

Form II: Verzweigte Sproßverbände von festerem Zusammenhalt.

Form III: Sproßverbände selten und nur 3—4 Glieder.

Mycelbildung war am stärksten bei Form II, schwächer bei Form III, am schwächsten bei Form I. Wachstumsform bei I Typus I, bei II anfangs Typus I, später Typus II, bei III zwischen Typus I und II.

b) Riesenkolonien (Tafel). Ein weiteres Mittel zur Gewinnung von unterscheidenden Merkmalen für die Sproßpilze in weitestem Sinne besitzen wir in den Wachstumserscheinungen der Riesenkolonien. Nach allen bis jetzt vorliegenden Erfahrungen sind jene unter den gleichen Verhältnissen, im besonderen bei gleicher Temperatur, auf den gleichen Nährböden konstant, auf verschiedenen Nährböden treten dagegen Variationen auf. So verschiedenartig aber in einzelnen Fällen die Wachstumsform der gleichen Art auf verschiedenen Nährböden zu sein scheint, so wird sie doch von demselben Wachstumsgesetz beherrscht. Es handelt sich nicht um prinzipielle, sondern nur um graduelle Verschiedenheiten[1]).

Das Gleiche gilt auch für die drei vorliegenden Pilzformen.

Da für diese und ähnliche Organismen jene Gesetzmäßigkeit, soweit ich mich erinnere, überhaupt noch nicht oder nicht genügend betont ist, sollen bei der Beschreibung der drei vorliegenden Pilzformen, abweichend von derjenigen von Saccharomyceten, die Wachstumserscheinungen der Riesenkolonien bei Zimmertemperatur auf verschiedenen Nährböden etwas eingehender geschildert werden.

Die Wachstumsform bei niederer Temperatur (7—9°) stimmt mit derjenigen bei höherer Temperatur im wesentlichen überein.

Für die Differenzierung der Wachstumserscheinungen ist, ähnlich wie bei den Kulturen in Nährflüssigkeiten, die größere oder geringere Neigung zur Mycelbildung von ausschlaggebender Bedeutung.

Sie kommt in der äußeren Erscheinung der Riesenkolonien scharf zum Ausdruck.

In der folgenden Übersicht sind nur in dem Falle die bei der Vergleichung der verschiedenen Altersstufen gemachten Beobachtungen (auch über die Färbung der Kolonien) verzeichnet, wenn sich gegenüber der vorher-

---

[1]) Will, H., Anleitung usw. p. 108

Tafel. Riesenkolonien.

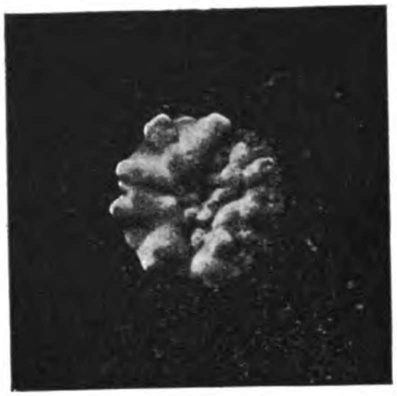


Fig. 1. Form I auf gehopfter Würzegelatine.

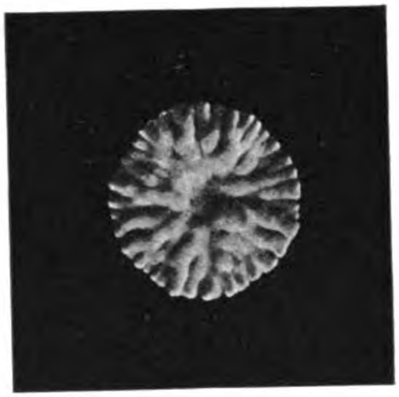


Fig. 2. Form II auf gehopfter Würzegelatine.

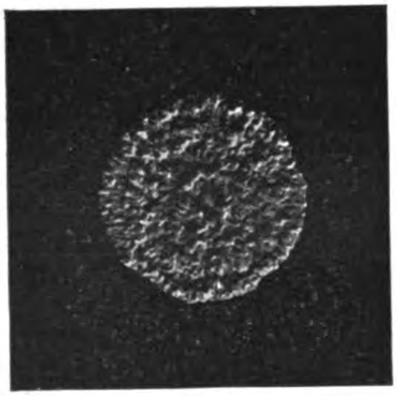


Fig. 3. Form III auf gehopfter Würzegelatine.

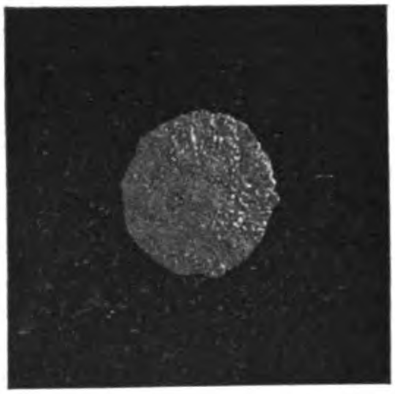


Fig. 4. Form I auf Gelbrübenwassergelatine.

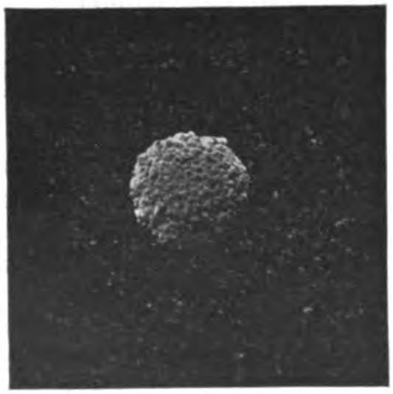


Fig. 5. Form II auf Krautwassergelatine.

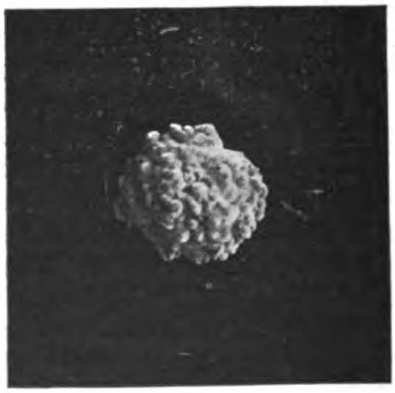


Fig. 6. Form III auf Krautwassergelatine.

gehenden Veränderungen geltend machten. Es gibt somit jeder Abschnitt der Tabellen ein allgemeines Bild von der Entwicklung der Riesenkolonien. Angefügt ist das Ergebnis der makro- und mikroskopischen Untersuchung der Kolonie nach Abschluß des Versuches, der sich mindestens auf 1 Monat, in einzelnen Fällen auch auf 2 Monate erstreckte.

Bemerkt sei noch, daß die Konsistenz und Beschaffenheit der Riesenkolonien bei Abschluß des Versuches fast auf allen Nährböden gleich war: ziemlich fest und trocken. Nur auf Kraut- und Kartoffelwassergelatine erwiesen sich die Kolonien als feucht und schmierig.

Verflüssigung der Gelatine trat auch in sehr alten Kulturen (3—4 Monate) nicht ein.

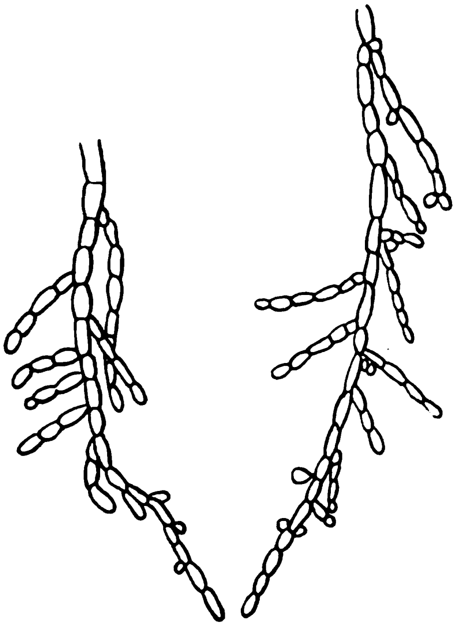


Fig. 12. Form II. Sproßmycel unterhalb einer Riesenkolonie auf Würzegelatine. 500 : 1.

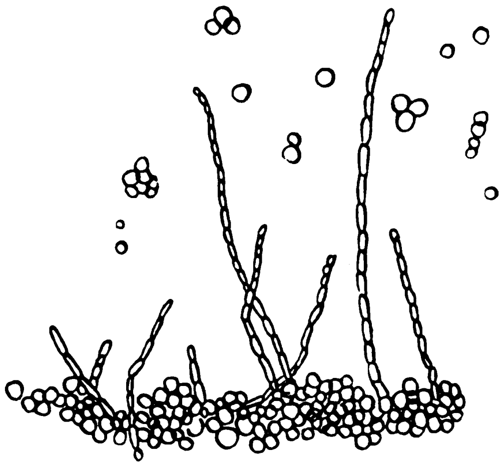


Fig. 13. Form II. Luftmycel aus Sproßverbänden bestehend. Kugelförmige Sproßzellen. Riesenkolonie auf Kartoffelwassergelatine. 500 : 1.

Gehopfte Würzegelatine.

Form I	Form II	Form III	Vergleichung
Am 4. Tage grünlich-schwarzer, nicht glänzender, glatter Belag; nach 8 Tagen Oberfläche des Belages gekörnt; nach 14 Tagen stellenweise lückenhafter, graugrüner, langhaariger Pelz an der Oberfläche. Belag unregelmäßig gefalt.	Am 4. Tage grünlich-schwarzer, gefalteter, samtartiger Belag; nach 14Tagen unregelmäßig verlaufende wellenförmige Faltungen auf der Oberfläche; nach 30 Tagen radialeFalten, an den peripheren Enden gegabelt. Pelz: Luftmycel	Nach 8 Tagen schwarzer, an der Oberfläche fein gekörnter, matter Belag; nach 14 Tagen gekröseartig gefaltet, nach 30 Tagen schwacher Anflug von Luftmycel, das die Färbung nicht beeinflußt. Die einzelnen Hyphen un-	Unterschied: Oberfläche der jungen Kolonie: bei Form I glatt, Form II samtartig glänzend (Luftmycel), Form III gekörnt. Oberfläche der älteren Kolonie bei Form II radial, bei Form I und III unregelmäßig gefaltet.

Gehopfte Würzegelatine.

Form I	Form II	Form III	Vergleichung
Pelz: Luftmycel in Bündeln angeordnet. An den Hyphen Konidien auf kurzem Mycelast sitzend (Fig. 2). Zellform d. Hauptschicht des Belages verschieden, Sproßzellen vorherrschend Gemmen häufig. Unter der zentralen Partie zahlreiche in spiraligen Windungen nach abwärts in die Gelatine wachsende Hyphen, welche in den tieferen Partien der Gelatine einzelnstehende Konidien, in den höheren größere Anhäufungen von solchen tragen.	steril und von gewöhnlichem Ausseh. Zellform der Hauptschicht des Belages verschieden. Sproßzellen vorherrschend, Gemmen häufig. Gelatine von verzweigten Verbänden langgestreckter Sproßzellen durchwachsen (Figur 12). Hyphen in der Gelatine nur vereinzelt.	gleichmäßig dick u. stark gebogen. Verschiedene Zellformen. Gemmenbildung. In der Hauptschicht Sproßzellen vorherrschend. Gelatine von verzweigten Verbänden langgestreckter Zellen durchwachsen (Figur 12).	Charakteristisch f. Form III ungleichmäßig dicke Hyphen des Luftmycels.

Ungehopfte Würzegelatine.

Form I	Form II	Form III	Vergleichung
Belag nach 1 Monat 5 mm dick und in der Mitte eingesenkt. Die glatte Oberfläche von kurzhaarigem grünen Mycel bedeckt und von samtartigem Charakter. Hyphen dicht in Bündeln beisammenstehend (Zotten) und steril. Dunkle (obere) u. hellgrüne (untere) Schicht des Belages aus Sproßzellen und Mycel zusammengesetzt. Stark gewundene sterile Hyphen unter der zentralen Partie innerhalb der Gelatine.	Belag nach 1 Monat 1—2 mm dick. Oberfläche mit unregelmäßig verlaufenden gekröseartig. Falten und von wolligem, grauem Pelz bedeckt. Im übrigen wie Form I.	Belag nach 1 Monat in der zentralen Partie stark gefaltet und von mausgrau., wolligem Mycel bedeckt. Hyphen häufig mit Anschwellungen und von kümmerlichem Aussehen. Sie tragen vereinzelte gedrungene Konidien, oft endständig. Randpartie der grünlich - schwarzen Kolonie schwach gefaltet und fast ohne Luftmycel. Hauptschicht: verschieden geformte Sproßzellen und Hyphen. Gelatine von spiralig gewundenen Hyphen, die einzelne oder in kleinen Gruppen stehende Konidien tragen, durchwachsen.	Form I unterscheidet sich von den beiden anderen durch die Höhe des Oberflächenbelages und durch den samtartigen Glanz des Luftmycels, das bei den anderen beiden Formen wolligen Charakter (Pelz) hat.

Die früheren Entwicklungsstadien stimmen mit jenen auf gehopfter Würzegelatine überein.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Kartoffelwasser-Gelatine.

Form I	Form II	Form III	Vergleichung
Am 4. Tage Oberfläche glatt, grünlich schwarz, lackartig glänzend; nach vierzehn Tagen von grauweißem, pelzartigem Luftmycel bedeckt. Luftmycel aus einreihigen Sproßverbänden; nach 1 Monat Pelz verschwunden, Oberfläche glatt rußschwarz u. feucht. Dunkle (obere) Schicht des Belages aus ovalen Sproßzellen bestehend. Gelatine von geraden u. spiralig gewundenen Hyphen, an welchen sich kugelförmige Haufen v. Konidien entwickelt hatten, durchwachsen.	Am 4. Tage grünlich-schwarzer, lackartig glänzender, glatter Belag; nach 14 Tagen gekröseartig gefaltet, nur die höchsten Erhebungen der Falten von spärlichem Luftmycel bedeckt. Mycel kurzgliedrig (Sproßmycel) und unverzweigt (Fig.13) Dunkle (obere) Schicht des Belages aus kugelförmigen Sproßzellen mit starker Wand u. großen, fast das ganze Lumen ausfüllenden Vakuolen. Charakteristisch sind große runde Riesenzellen. Wachstum in der Gelatine nicht vorhanden.	Am 4. Tage glatter grünlich - schwarzer, nicht glänzender Belag; nach 14 Tagen Oberfläche fein gekörnt und vorübergehend einige weiße Flecken von Luftmycel. Nach 1 Monat am Rand der Kolonie konzentrische Ringe mit gekörnter Oberfläche. Belag aus runden starkwandigen Sproßzellen, außerdem auch ovale. In der Gelatine spiralig gewundene Zellfäden, die ungleichmäßig dick u. verzweigt sind. Endständige Konidien.	Oberfläche der jungen Kolonie bei Form I u. II glatt, lackartig glänzend, bei Form III matt. Später Form I schwach gefaltet, Form II stark gefaltet, Form III gekörnt. Bleibendes Luftmycel nur bei Form II auf den Falten. Vorübergehendes bei Form I als weißgrauer Pelz, bei Form III als weiße Flecken. Bei Form III ungleichmäßig dicke Hyphen in der Gelatine.

Gelbrübenwasser-Gelatine.

Form I	Form II	Form III	Vergleichung
Nach 8 Tagen Riesenkolonie mit prächtiger, grüner, durch Luftmycelentwicklung samtartiger Oberfläche; nach 1 Monat Kolonie stark aufgewölbt (ca.5mm) u. von langhaarigem, grauem Pelz bedeckt Luftmycel in Bündeln (Zotten) angeordnet (Fig. 14). Belag aus 2Schichten: dunkle (obere) u. helle (untere), aus Sproßzellen u. Mycel zusammengesetzt. Hyphen in der Gelatine mit einzelnen Konidien und klei-Konidien u. kleinen Gruppen von solchen.	Die ganze Entwicklung u. Beschaffenheit der Riesenkolonie stimmt mit der von Form I überein u. unterscheidet sich nur dadurch, daß der Belag der 4 Wochen alten Kolonie flach ausgebreitet ist u. zahlreiche kleine Falten zeigt. Die Sproßzellen in der dunklen (oberen) Schicht sind zumeist einreihigen Verbänden von 6—10 Gliedern vereinigt.	Nach 8 Tagen schwarzer Belag mit feinen radialen Falten; nach 1 Monat zentrale u. Randpartie hellgrün. Dazwischen liegende Ringzone dunkelgrün. Belag mäßig stark und gewölbt. Luftmycel von kümmerlichem Aussehen. Dunkle (obere) u. helle (untere)Schicht des Belages aus verschiedenen Formen von Sproßzellen bestehend. Hyphen in der Gelatine stark spiralig gewunden und ungleichmäßig dick, vielfach verzweigt u. oft mit endständigen Konidien.	Form I u. II. zeigen in bezug auf Form der Kolonie die nämlichen Verschiedenheiten wie auf ungehopfter Würzegelatine. Form I stark in die Höhe gewachsen. Form II flach ausgebreitet. Form III steht mit einem mäßig gewölbten Belag zwischen Form I u. II und zeigt auch hier unregelmäßige Anschwellungen der Hyphen in der Gelatine.

Krautwasser-Gelatine.

Form I	Form II	Form III	Vergleichung
Trotz wiederholter Impfung kein Wachstum.	Nach 1 Monat hochaufgewölbter Belag mit warzenartigen Erhebungen (Maulbeerform) u. samtartigem Luftmycel aus unverzweigten Verbänden von Sproßzellen; nach weiteren 14 Tagen zentrale Partie braunviolett, Rand spangrün. Dunkle (obere) Schicht des Belages aus runden Sproßzellen, helle (untere) Schicht aus regelmäßig u. unregelmäßig gestalteten langgestreckten Zellen u. aus Mycel zusammengesetzt.	Nach 1 Monat wie Form II. Dunkle (obere) u. helle (untere) Schicht des Belages aus runden Sproßzellen bestehend. Keine Hyphen in der Gelatine.	Das Wachstum von Form II u. III ist im allgemeinen gleich. Die warzenartigen Erhebungen sind jedoch bei Form II größer.

In den ersten Wochen bei II und III hellgrüner, glatter, feuchter Belag, Oberfläche später schwach gefaltet.

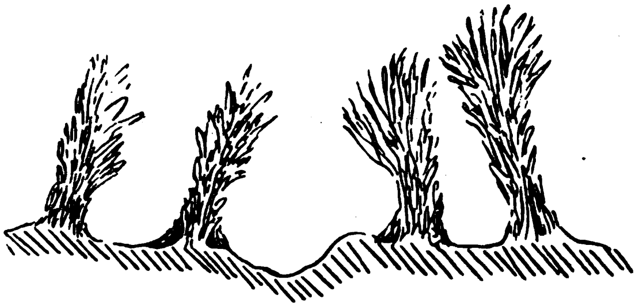


Fig. 14. Form II. Luftmycel der Riesenkolonie auf Gelbrübenwassergelatine. Hyphen zu Bündeln vereinigt. ca. 180 : 1.

Wie aus der kurzen Beschreibung und den Photogrammen auf der Tafel hervorgeht, haben die Riesenkolonien der sogenannten schwarzen Hefen durchaus keine Ähnlichkeit mit denjenigen der Saccharomyceten, Torulaceen und Mycodermen. Infolge des pelzartigen Überzuges und der groben Faltungen sehen sie vielmehr den Kolonien gewisser Schimmelpilze, wie Penicillium, auf festen Nährböden ähnlich. Es trifft dies besonders für die Kolonien auf den Nährböden zu, auf welchen eine starke Hyphenentwicklung stattfindet, also für die günstig zusammengesetzten.

Ungehopfte Würzegelatine hat sich als der geeignetste Nährboden für die volle Ausprägung der charakteristischen Wachstumserscheinungen erwiesen, der Unterschied gegenüber gehopfter Würzegelatine ist jedoch nur gering. Dann folgen der Reihe nach Gelbrübenwasser-, Kartoffelwasser- und Krautwassergelatine. Die Mycelentwicklung und Faltenbildung auf der Oberfläche ist in dem gleichen Sinne abgestuft. Die Faltenbildung tritt bei Form III schon auf Gelbrübenwassergelatine zurück und in noch höherem Grade auf Kartoffelwassergelatine. Auf Krautwassergelatine kamen sowohl

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

bei Form II wie bei Form III als Ausdruck eines stärkeren lokalen Wachstums der Oberfläche der Kolonie größere und kleinere Höckerchen zum Vorschein, die nicht mehr zur Faltenbildung überleiteten.

Vergleicht man die Riesenkolonien der einzelnen Formen auf den verschiedenen Nährböden, so möchte es den Anschein gewinnen, als ob besonders bei Krautwasser- und Kartoffelwassergelatine prinzipielle Unterschiede zur Geltung kämen. Die Entwicklungsgeschichte der Kolonien zeigt jedoch auch in diesem Falle, daß es sich nicht um prinzipielle, sondern nur um graduelle Unterschiede handelt, die in der mehr oder weniger günstigen Zusammensetzung des Nährbodens ihren Grund haben. Die Riesenkolonien auf Krautwasser- und Kartoffelwassergelatine erscheinen auf Grund dessen als in der Entwicklung zurückgeblieben.

Zur Charakteristik der Riesenkolonien möge noch hervorgehoben sein, daß Form II auf den gleichen Nährböden stets ein größeres Flächenwachstum und damit im Zusammenhang stehend eine stärkere Faltenbildung als Form I und III aufweist.

Physiologie. Generationsdauer. Sie wurde für die Sproßkonidien mit geringer Abänderung nach Hoyer[1]) ermittelt. Die nach 3—4 Tagen in gehopfter Würze vorhandenen Sproßgenerationen, welche aus eingeimpften Konidien hervorgegangen waren, und sich noch in lebhafter Vermehrung befanden, wurden in frsicher Nährflüssigkeit verteilt. Die Mischung diente zur Anfertigung von Adhäsionskulturen nach P. Lindner, und zwar auf geteilten Deckgläsern nach Will. Die Felder der verwendeten Deckgläser, in welchen sich nur eine Zelle befand, wurden markiert und die Kulturen zu 25° gestellt. Nach 20 Stunden wurden die aus einer Sproßkonidie entstandenen Zellen gezählt.

Die Generationsdauer wurde nach der auch von Pedersen[2]) benutzten Formel berechnet:

$$M = 2^{\frac{t}{x}} \text{ oder } x = \frac{\log 2 t}{\log M.}$$

wobei M die Zahl der im Durchschnitt aus einer Zelle während der Versuchsdauer erzeugten Zellen, t die Versuchsdauer, x die gesuchte Generationsdauer bezeichnet.

Für ein exaktes Ergebnis müssen folgende Bedingungen erfüllt sein. Erstens muß die Sprossung des Organismus eine zweiteilige und nicht etwa eine drei- oder vierteilige sein. Dies trifft für die Sproßkonidien der sog. schwarzen Hefen zu. Zweitens müssen die zur Anfertigung der Adhäsionskultur benutzten Zellen sich schon in Sprossung befinden. Bei Aussaat von ruhenden Zellen würde die Zeit, welche zur Vorbereitung für die erste Sprossung innerhalb der Zelle notwendig ist, mitgerechnet werden und sich hieraus eine zu lange Generationsdauer ergeben. Drittens darf der Versuch nicht zu lange ausgedehnt werden, da, abgesehen davon, daß eine genaue Zählung erschwert, ja unmöglich gemacht wird, die allmählich sich häufenden Umsetzungsprodukte der Zellen und eintretender Nahrungsmangel hemmend wirken können.

Form III erweist sich also auch hinsichtlich der Generationsdauer bei Vermehrung der Konidien durch Sprossung als etwas verschieden von den beiden übrigen Formen. Die Generationsdauer ist mit 8 Stunden und 13 Minuten die längste. Die kürzeste Generationsdauer hat sich mit 4 Stunden 48 Minuten bei Form II ergeben. Form I steht mit 5 Stunden 8 Minuten zwischen Form II und III.

---

[1]) Hoyer, D. P., Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Bd. 28. 1900. p. 37; vergl. auch Will, H. u. Heinrich, F., Saccharomyces anamensis, die Hefe des neueren Amyloverfahrens (dieses Centralbl.).

[2]) Pedersen, R., Compt. rend. Carlsberg Laborat. T. 1. 1878. p. 22.

	Temperatur	Anzahl der nach 20 Stunden gewachsenen Zellen	Im Durchschnitt aus einer Zelle entstanden	Generationsdauer
I.	25°	14, 13, 17, 16, 17, 15, 17, 17, 18, 17, 13, 12, 11, 14, 15, 16, 14, 15, 16, 14, 15, 14, 13	14,8	5 Std. 8 Min.
II.	25°	17, 17, 20, 21, 16, 14, 16, 19, 15, 18, 17, 16, 20 usw. 45 Zählungen	17,8	4 Std. 48 Min.
III.	25°	5, 5, 4, 4, 4, 7, 5, 7, 4, 9, 6, 8, 7, 5, 6, 6, 4, 6 usw. 36 Zählungen	5,4	8 Std. 13 Min.

Einfluß verschiedener Temperaturen. Das Verhalten gegenüber hohen, sowie gegenüber niedrigen Temperaturen kann für die Unterscheidung von Sproßpilzen wertvolle Anhaltspunkte geben. Daher wurde untersucht, inwieweit dies auch für die drei vorliegenden Pilzformen zutrifft. Es sollten ermittelt werden: 1. Die Grenztemperaturen für die Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen in Flüssigkeit, 2. die Grenztemperaturen für die Vermehrungsfähigkeit in Nährlösung.

ad 1. Reagensröhrchen wurden mit 10 ccm gehopfter Bierwürze beschickt, mit dem betreffenden Pilz geimpft und mit Watte verschlossen. Das Aussaatmaterial stammte aus einer 3 Wochen alten Kultur in Würze. Ältere Kulturen wurden aus dem Grunde verwendet, weil diese zahlreiche Gemmen enthalten, welche voraussichtlich gegen Temperatureinwirkung widerstandsfähiger sind. Die Reagensröhrchen wurden hierauf in einem Wasserbad 30 Minuten lang bei jedem der untersuchten Temperaturgrade belassen. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen bei Zimmertemperatur zur Beobachtung aufgestellt. Die Temperaturen lagen zwischen 40 und 60° C, und zwar von 5 zu 5 Grad ansteigend.

Der Versuch ergab, daß unter den eingehaltenen Bedingungen 50° C jedes Wachstum unterdrückten, während bei 45° C nach achttägiger Beobachtungszeit noch ein kräftiges Wachstum bemerkbar war. Nach dem Erhitzen bei 48° C, welche Temperatur nachträglich geprüft wurde, trat unter den nämlichen Bedingungen wohl noch eine Entwicklung ein, diese hatte jedoch in ihrem ersten Stadium eine bedeutende Verzögerung erfahren.

ad 2. Die höchste Temperatur, bei welcher noch Vermehrung eintritt, wurde derart ermittelt, daß mit 10 ccm Bierwürze beschickte Freudenreichkölbchen mit 2 Platinösen aus dem Bodensatz einer in Bierwürze herangezüchteten Kultur geimpft und in einem Thermostaten aufgestellt wurden. Der Versuch begann bei 30° C. Machte sich eine Entwicklung bemerkbar, so wurde die Temperatur um einen Grad erhöht und ein neuer Versuch durchgeführt. Die Kulturen blieben 20 bis 30 Tage stehen.

Die obere Grenztemperatur für die Vermehrung lag gleichmäßig bei 35° C.

Die tiefste Temperatur, die noch eine Vermehrung gestattet, konnte nicht bestimmt werden, da bei Aufstellung von Kulturen im Hopfenkonservierungsraum einer Brauerei, dessen Temperatur von 0—2° C schwankte, noch eine schwache Vermehrung eintrat, tiefere Temperaturen aber nicht zur Verfügung standen. Bei den Temperaturen 0—2° C war die Farbstoffbildung sehr mangelhaft. Die Zellen erschienen unter dem Mikroskop selbst in größeren Haufen fast ganz farblos. Dieselbe Erscheinung trat bei einer in Hefewasser bei niederer Temperatur herangezüchteten Kultur auf, während bei gewöhnlicher Temperatur in Hefenwasser eine deutliche Braunfärbung eintritt.

Das schwache Wachstum und die reduzierte Farbstoffbildung deuten jedenfalls darauf hin, daß jene Temperaturgrade dem Grenzwert sehr nahe liegen.

Die Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen und die Grenztemperatur für die Vermehrungsfähigkeit ließen Unterschiede zwischen den drei Pilzformen nicht erkennen. Unterscheidende Merkmale waren also aus jenen nicht zu gewinnen.

Entwicklungshemmung und Abtötung durch Äthylalkohol. Der Versuch bezweckte, diejenige Höchstmenge von Alkohol zu ermitteln, bei welcher unter Anwendung von Würze als Nährlösung noch eine Vermehrung stattfindet. Sterilisierte Bierwürze wurde mit 1, 2, 3 bis 12 Vol.-Proz. Alkohol versetzt. Um den Zusatz genau bemessen zu können, wurden immer größere Mengen (500 ccm) Würze mit der betreffenden Alkoholmenge versetzt und die Mischung auf sterile Freudenreichkölbchen verteilt. Bei allen drei Organismen fand während einer Beobachtungszeit von 12 Tagen bei Zimmertemperatur nur bis zu 4 Proz. Alkoholzusatz ein Wachstum statt, während die Kölbchen mit 5 Proz. mehrere Wochen hindurch steril blieben. Die beim Wachstum beobachteten Erscheinungen sind schon in dem Abschnitt: Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit gewürdigt worden.

Um die Alkoholkonzentration zu ermitteln, bei welcher unter den gegebenen Verhältnissen Abtötung aller Zellen der drei Organismen erfolgt, wurde von den Kulturen, in welchen eine Vermehrung nicht mehr stattgefunden hatte, die alkoholhaltige Bierwürze vorsichtig abgegossen und durch frische Würze ohne Alkohol ersetzt. Befanden sich in dem Bodensatz noch lebensfähige Zellen, so kam es nachträglich in der Bierwürze zu einem kräftigen Wachstum. Als Grenzkonzentration, bei welcher die Abtötung der Einsaat unter den gegebenen Verhältnissen erfolgte, wurden 11 Vol.-Proz. Alkohol gefunden.

Die drei Pilzformen verhielten sich auch in dieser Versuchsreihe gleich.

Verhalten gegenüber organischen Säuren. Der Versuch über die Einwirkung von organischen Säuren ging von verschiedenen Gesichtspunkten aus.

In erster Linie sollte ermittelt werden, bei welcher Konzentration der angewandten Säuren unter den gegebenen Bedingungen noch ein Wachstum stattfindet (Grenzwert für die Vermehrungsfähigkeit). Bekanntlich verhalten sich in dieser Hinsicht verschiedene Sproßpilze verschieden, und ihr Verhalten gegenüber organischen Säuren bietet brauchbare Unterscheidungsmerkmale. Ferner wurde untersucht, ob durch den Einfluß von bestimmten Säuren das Auftreten von charakteristischen Erscheinungen an den drei Pilzen veranlaßt wird und ob diese allen drei Pilzen gemeinsam sind oder nicht. Endlich sollte der Versuch noch zeigen, ob die Pilze befähigt sind, Säure aus der Nährlösung zu assimilieren. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß Säuren auch als Stoffwechselprodukte der Pilze auftreten können.

Als Kulturflüssigkeit wurde mineralische Nährlösung nach Hayduck mit Peptonzusatz als Stickstoffquelle gewählt. Allerdings stellte sich später heraus, daß Pepton eine weniger günstige Stickstoffquelle für die drei Pilze ist. Von Säuren kamen Äpfelsäure, Zitronen-, Wein-, Bernstein-, Milch- und Essigsäure zur Anwendung.

Der Säurezusatz wurde so bemessen, daß Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 Proz. mit annähernder Genauigkeit entstanden. Hierauf wurde die Nährlösung in Mengen von je 100 ccm auf Pasteurkölbchen abgefüllt und im Dampftopf sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde der Säuregehalt für jede Konzentration in Probekölbchen durch Titrieren von 5 ccm der Nährlösung mit n/10 NaOH genau festgestellt. Indikator Phenolphtalein.

Für die in der Regel schädliche Essigsäure wurden die Konzentrationen 0,25, 0,5, 1 und 2 Proz. gewählt.

Die so vorbereiteten Kölbchen wurden mit je 3 Platinösen aus dem Bodensatz einer 8 Tage alten Würzekultur geimpft, bei durchschnittlich 17° C (Kellerraum) aufgestellt und nach 6 Wochen untersucht.

Der charakteristischen Wachstumserscheinungen an den kleinen Pilzrasen der Oberflächenvegetation wurde schon früher Erwähnung getan.

Folgende Tabelle enthält, in Prozenten der Säuren ausgedrückt, die Konzentrationen, bei welchen während einer Beobachtungszeit von 6 Wochen gerade noch deutliche Anzeichen von Wachstum zu verzeichnen waren, also die Grenzwerte für die Vermehrungsfähigkeit.

	Apfelsäure	Zitronensäure	Weinsäure	Bernsteinsäure	Milchsäure	Essigsäure
I.	4	4	2	2	1	—
II.	5	5	2	3	2	—
III.	5	5	2	3	2	—

Bei Gegenwart von Essigsäure in den gewählten Konzentrationen trat überhaupt kein Wachstum auf.

Die Grenzwerte für die Vermehrungsfähigkeit sind also bei Form II und III die gleichen. Form I ist etwas empfindlicher, und die Grenzwerte liegen durchschnittlich um 1 Proz. niedriger als bei Form II und III.

Um eine etwaige Änderung der Säurekonzentration durch die drei Pilzformen während der Versuchsdauer zu erkennen, wurde bei Abschluß des Versuches nach ca. 6 Wochen der Inhalt jedes Kölbchens in einen 200 ccm-Meßkolben gespült und zur Marke aufgefüllt. 10 ccm davon wurden mit n/10 NaOH titriert. Zur Titration wurden in den einzelnen Versuchsreihen von jeder Säure die Konzentrationen 0,5, 1 und 2 Proz., bei welchen das kräftigste Wachstum stattgefunden hatte, gewählt.

Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der Titration vor der Beimpfung der Kölbchen und nach dem Wachstum der Pilze zusammen. Die Zahlen bedeuten verbrauchte Kubikzentimeter n/10 NaOH.

Da sich die bei Abschluß des Versuches wiedergefundenen Säurekonzentrationen gegenüber den ursprünglichen nicht wesentlich geändert haben (die Unterschiede liegen im allgemeinen innerhalb der Fehlergrenzen), darf geschlossen werden, daß eine Assimilierung der geprüften Säuren durch die

	Apfelsäure			Zitronensäure			Weinsäure			Bernsteinsäure			Milchsäure		
Konzentration in Prozenten . .	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
Konzentration (ausgedrückt in n/10 NaOH auf 5 ccm)	12,4	15,9	22,3	11,7	15,8	23,0	11,7	13,1	17,3	12,6	17,0	25,2	11,1	14,0	19,9
Form I	12,6	15,5	22,1	11,6	15,5	22,4	11,9	12,9	17,0	12,4	17,3	25,2	10,8	13,9	—
„ II	12,6	15,6	22,3	11,6	16,1	22,6	11,4	12,8	17,2	12,6	17,0	25,3	11,2	14,0	19,9
„ III	12,2	15,5	22,5	11,4	15,8	23,1	11,5	12,9	17,1	11,0	15,2	24,2	11,0	13,9	19,8

drei Organismen nicht stattfand. Nur bei der Bernsteinsäure geht, und zwar ausschließlich bei Form III, der Unterschied zwischen der ursprünglichen Azidität der Nährlösung und derjenigen nach einer sechswöchentlichen Versuchsdauer, und zwar gleichmäßig bei den 3 Konzentrationen weit über die zulässige Fehlergrenze hinaus. Man darf daher wohl annehmen, daß die Bernsteinsäure von Form III, wenn auch nur in geringem Maße, angegriffen worden war.

Prüfung auf Gärvermögen. Marpmann[1]) gibt an, daß sein Saccharomyces niger bei Gegenwart von Dextrose in der Nährlösung schwache Gärung hervorgerufen habe. Mit Rücksicht hierauf wurde in zwei Versuchsreihen geprüft, ob unsere drei Pilze befähigt sind, Zucker in Alkohol und Kohlensäure zu spalten.

In einem orientierenden Versuch kam die Kleingärmethode nach P. Lindner zur Anwendung. Der Hauptversuch wurde, wie immer, in größerem Maßstabe durchgeführt.

In beiden Versuchen wurden folgende Zucker bei 25° C geprüft. Dextrose, Lävulose, Saccharose, Maltose, Milchzucker und Galaktose.

Die Kleingärmethode ergab in allen Fällen ein negatives Resultat. Kohlensäurebläschen wurden auch bei Wiederholung des Versuches bei keinem Zucker während einer Beobachtungsdauer von 20 Tagen bemerkt.

Zu dem Versuch in größerem Maßstabe dienten je 50—60 ccm der mineralischen Nährlösung nach Hayduck mit einem Zusatz von 5 Proz. Zucker. Nach 3 Wochen hatte kräftiges Wachstum stattgefunden.

Die Prüfung der Kulturen auf Alkohol erfolgte in der Weise, daß die ganze Nährflüssigkeit in einen Destillierkolben gebracht und von ihr ungefähr 15 ccm abdestilliert wurden. Die Reaktion auf Alkohol im Destillat erfolgte zunächst mittels der Jodoformreaktion.

Außerdem wurde das Destillat nach dem von Klöcker[2]) beschriebenen Verfahren, mittels dessen man noch die geringsten Spuren von Alkohol (0,002 Vol.-Proz.) erkennen kann, nachgeprüft. In keinem der Destillate war Alkohol vorhanden. Damit war also auch das Ergebnis der Kleingärmethode durch den in größerem Maßstabe durchgeführten Versuch bestätigt.

Die drei Pilzformen vermögen also keine alkoholische Gärung hervorzurufen, Zucker in Kohlensäure und Alkohol zu spalten.

Verhalten gegenüber verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. Zweck des Versuches war, zu prüfen, inwieweit die drei Pilzformen ihren Stickstoff- und Kohlenstoffbedarf aus verschiedenen Quellen zu decken vermögen, und welche von diesen das Wachstum am meisten begünstigt.

---

[1]) a. a. O.

[2]) Klöcker, Alb., Compt. rend. Carlsberg Laborat. T. 10. Lief. 1. 1911. p. 99.

Als Grundlösung diente die Hayducksche Nährlösung. Von den verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen wurden zu dieser je 2 Proz. zugesetzt. Die Nährlösungen wurden in Mengen von je 50 ccm auf Erlenmeyerkölbchen verteilt, sterilisiert, geimpft und bei Zimmertemperatur aufgestellt. Die äußerlich sichtbaren Wachstumserscheinungen sind schon in dem Abschnitt: Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit berücksichtigt worden.

Stickstoffquellen waren: Asparagin, Ammonsulfat und Pepton. Als Kohlenstoffquellen dienten: Dextrose, Saccharose und Maltose.

Asparagin erwies sich bei Gegenwart aller Zucker als Stickstoffquelle sehr geeignet. Die einzelnen Organismen zeigten keine wesentliche Verschiedenheit. Ammonsulfat erschien dagegen unter den gleichen Verhältnissen weniger geeignet. Wenn auch in den Kulturen noch eine gute Entwicklung stattgefunden hatte, so mangelte es doch fast überall am Farbstoff. Die Pilzrasen waren mißfarbig, braungrün bis graugrün. Pepton, von allen die schlechteste Stickstoffquelle, bot kaum für ein schwaches Wachstum genügend Nahrung. Eine Oberflächenvegetation fehlte.

Am besten wurde bei Gegenwart aller verwendeten Stickstoffquellen Dextrose assimiliert, weniger Saccharose. Bei Gegenwart letzterer kam aber immerhin noch ein kräftiges Oberflächenwachstum zustande. In noch geringerem Maße wurde Maltose assimiliert. Oberflächenwachstum trat entweder überhaupt nicht auf, oder war nur schwach angedeutet.

Die Assimilationsversuche mit verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen ergaben also, daß die drei Pilze den in den verwendeten Nährlösungen dargebotenen Stickstoff und Kohlenstoff zu assimilieren vermögen, daß aber ihre Verwertbarkeit nicht auf gleicher Stufe steht.

Zusammenfassung.

Das Hauptergebnis der Untersuchung ist, daß die drei Pilzformen morphologisch und physiologisch einander sehr nahe stehen. Die Verschiedenheiten der einzelnen Formen sind so gering, daß sehr wahrscheinlich nur Varietäten der gleichen Art in Frage stehen. Die folgende Übersicht soll dies veranschaulichen.

Die drei Pilzformen sind Hyphomyceten. Sie besitzen einerseits ein typisches Mycel von annähernd gleichem Durchmesser, andererseits erzeugen sie ein Sproßmycel, das sich verschieden verhält. Das typische Mycel erscheint wenig verzweigt. Es erzeugt entweder direkt oder auf ganz kurzen Seitenästen gestreckt-ellipsoidische, eiförmige oder kugelförmige Konidien. Diese Konidien vermehren sich entweder in zahlreichen Generationen durch Sprossung, oder sie wachsen direkt wieder zu Hyphen aus. Konidien mit verdickter Wandung (Gemmen). Keine Sporenbildung in den Sproßzellen. Wandung der Hyphen anfangs farblos, später olivgrün, häufig verdickt (Gemmen). Zellinhalt blaß, mit größeren, stark lichtbrechenden Körperchen. In Nährlösungen Entwicklung von Pilzrasen, sowohl an der Wand des Kulturgefäßes festsitzend als auch freischwimmend. Bodensatz entweder schlammartig oder flockig, je nachdem er aus Sproßkonidien oder aus Mycel besteht. Bei starkem Wachstum Vereinigung der längs des Flüssigkeitsrandes festsitzenden Rasen zu einem Ring, der freischwimmenden zu einer Oberflächen-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

vegetation. Ring weich knorpelig, oberhalb der Flüssigkeit dunkel, innerhalb dieser hell gefärbt. Oberflächenvegetation entweder weich, mehr oder weniger glatt, schwarz gefärbt und lackartig glänzend oder knorpelartig, dick, samtartig oder wollig, grau- bis dunkelgrün gefärbt. Pilzrasen: dichtes Gewebe von Hyphen mit zahlreichen eingeschlossenen Konidien. Zottenbildung an der Oberfläche der Pilzrasen in sehr günstig zusammenegsetzten Nährlösungen. Einzellkolonien auf festen Nährböden anfangs Typus I, später Typus II. Oberfläche der Riesenkolonien im ersten Entwicklungsstadium auf günstig wie auf ungünstig zusammengesetzten Nährböden mehr oder weniger glatt, dunkelgrün bis schwarz gefärbt (Charakter wie bei den Saccharomyceten). Auf günstigen Nährböden Oberfläche später grob gefaltet, samtartig oder von einem „Pelz“ (Luftmycel) bedeckt, graugrün bis dunkelgrün gefärbt. Konsistenz des Belages meist ziemlich fest und trocken, auf manchen Nährböden feucht und schmierig. Belag aus zwei Schichten: Luftmycel, dichtere Hauptschicht. Von der Unterseite des Belages aus lockere Fortsätze im Nährboden. Luftmycel und Hyphen, oft in Bündeln, auf weniger günstigem Nährboden einreihige Verbände von Sproßzellen. Dichtere Hauptschicht im oberen Teil meist dunkelgrün, im unteren hellgrün gefärbt. Hauptschicht aus Mycel und Sproßzellen zusammengesetzt. Hyphen der Fortsätze in festen Nährböden spiralig gewunden, steril oder mit Konidien; zuweilen reichlich verzweigte Verbände langgestreckter Sproßzellen. Obere Grenztemperatur für die Wachstumsfähigkeit 35° C. Grenztemperatur bei 30 Minuten langem Erhitzen 48° C. Entwicklungshemmung in Würze durch 4 Vol.-Proz. Äthylalkohol, Abtötung durch 11 Vol.-Proz. Widerstandsfähigkeit gegen Säuren gering. Keine Säureassimilation, ausgenommen Bernsteinsäure durch Form III. Kein Gärvermögen.

Die einzelnen Formen unterscheiden sich durch folgende Merkmale.

Form I. Sproßzellen gestreckt-ellipsoidisch. Variationen: kugelförmig, langgestreckt wurstförmig; oft apiculatusähnlich zugespitzt. Gestreckt-ellipsoidische Zellen 8,5 : 3,9 μ. Sproßzellen meist isoliert, selten parallel gelagert, zuweilen zu je 3—5 in kreuz- oder sternförmiger Anordnung, Riesenzellen. Generationsdauer 5 Stunden 8 Minuten.

Form II. Sproßzellen eiförmig. Variationen häufiger als bei Form I: kugelförmig, wurstförmig und unregelmäßig gestaltet. Sproßzellen einander mit breiter Basis aufsitzend und dauernd zu einreihigen oder verzweigten, sparrigen Verbänden vereinigt. Eiförmige Zellen 7,6 : 3,9 μ, kugelförmige 5,15 μ. Generationsdauer 4 Stunden 48 Minuten.

Form III. Sproßzellen kugelförmig. Variationen häufig: gestreckt-ellipsoidisch, eiförmig und wurstförmig. Zellinhalt etwas stärker lichtbrechend. Neigung zur Mycelbildung geringer als bei Form I und II. Hyphen sehr oft mit unregelmäßigen Anschwellungen. Durchmesser der kugelförmigen Sproßzellen 4,5 μ. Sproßzellen sehr frühzeitig getrennt. Selten Verbände von 4—6 Gliedern. In vereinzelten Fällen Tochterzellen wie bei typischen Torulaformen nahezu rechtwinkelig zueinander stehend. Riesenzellen. Generationsdauer 8 Stunden 13 Minuten. Assimiliert Bernsteinsäure.

Nach eingehender Darlegung der Morphologie der als Saccharomyces niger, Torula nigra und „schwarze Hefe“ bezeichneten Organismen ist noch die systematische Stellung jener Formen zu erörtern. Infolge der von Hansen ausgesprochenen Anschauung, nach welcher sich die sogenannten „schwarzen Hefen“ an Cladosporium oder Fumago angliedern, lag es nahe, verschiedene Arten dieser beiden Pilz-gruppen mit den drei untersuchten Formen zu vergleichen. Zu diesem Zwecke dienten Reinkulturen von Cladosporium herbarum und einigen Fumagoarten von Getreideähren, Haselnuß, Lorbeer und Ahorn. Allein schon bei oberflächlicher Betrachtung der Kulturen zeigte sich, daß unsere drei Pilzformen mit dem Vergleichsmaterial kaum Ähnlichkeit hatten.

Guilliermond zufolge sollen sich die „schwarzen Hefen" am Dematium anschließen. Daher wurden auch nach dieser Richtung hin Vergleiche angestellt. Nun besteht zwar hinsichtlich der Konidienbildung und zuweilen auch hinsichtlich der Konidienform eine gewisse Ähnlichkeit mit Dematium, immerhin besteht aber auch wieder ein großer Unterschied gegenüber jenen in der Art und Weise, wie bei unseren drei Pilzformen die Koniden angeordnet sind. Wesentliche Unterschiede ergeben sich durch die Gemmenbildung bei Dematium, die Zerteilung der Hyphen durch Querwände in kurze, mehr oder weniger dunkelbraun gefärbte Glieder, die vielfach durch Horizontalwände nochmals geteilt erscheinen, ferner durch die Durchwachsungserscheinungen, endlich durch die Veränderung der Kulturflüssigkeiten, welche bei Dematium fadenziehend werden.

Für die Bestimmung der systematischen Stellung der drei Pilzformen reichen die bis jetzt erlangten Untersuchungsergebnisse nicht aus. Es müßte vor allem der Versuch gemacht werden, nach mykologischen Methoden eine höhere Fruktifikationsform zu erziehen. Solche Versuche bleiben vorbehalten. Solange nach dieser Richtung keine Aufklärung erreicht ist, erscheint es nicht angebracht, eine neue Benennung für die untersuchte Pilzart und ihre Varietäten vorzuschlagen.

Soviel steht jedenfalls fest, daß die Bezeichnungen Saccharomyces niger, Torula nigra und „schwarze Hefe" für die beschriebene Pilzart und ihre Varietäten, da sie in keiner Weise gerechtfertigt sind, fallen müssen.

Die Zeichnungen und photographischen Aufnahmen hat Herr Noldin gefertigt.

München, Juli 1913.

Nachdruck verboten.

Saccharomyces anamensis, die Hefe des neueren Amyloverfahrens.

[Mitteilungen der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München.]

Nach Untersuchungen von Franz Heinrich[1]).

Von **H. Will.**

Mit 21 Figuren im Text.

A. Allgemeines.

Die als „Levure anamite" bezeichnete Hefe findet erst seit kurzem beim Amyloverfahren Verwendung. Sie wurde aus einem Gemenge wilder

---

[1]) Die Untersuchungen, deren Hauptergebnisse hier mitgeteilt werden, sind mit Ausnahme der Gärversuche in Maismaischen, von F. Heinrich unter meiner Leitung im physiologischen Laboratorium der Wissenschaftlichen Station durchgeführt und in erweiterter Form unter dem Titel: „Saccharomyces anamensis, die Hefe des neueren Amyloverfahrens. Mit einer Einleitung: Über das Amyloverfahren" im Jahre 1912 als Dissertation an der Kgl. Technischen Hochschule zu München eingereicht worden.

Hefen, wie sie auf dem Zuckerrohr und damit auch in den Zuckerrohrmaischen Cochininas auftreten, reingezüchtet. Maßgebend für die Auswahl dieser Reinzucht war ihre hohe Gärtemperatur, weil beim Amyloverfahren die Gärung bei 35—38° C verläuft. Bei diesen Temperaturen entwickelt sich aber auch der Amylopilz (Rhizopus Delemar [Boid.] Wehm. et Hanz.[1])). Damit war das Zusammenarbeiten beider Organismen in der Maische ermöglicht.

Die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen bildete eine uns mit gütiger Erlaubnis der Sprit-Automatenbaugesellschaft zu Köln a. Rh. von der Kgl. Lehr- und Versuchsbrennerei Weihenstephan in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellte Kultur von Levure anamite auf schräg erstarrtem Würzeagar, wie sie zur Beimpfung der Gärbottiche verwendet wird.

Zunächst wurden von dem Material nochmals Reinkulturen hergestellt und von diesen nach genauer Prüfung der Erscheinungen sechs abgeimpft. Eine orientierende Untersuchung sollte darüber Aufschluß geben, ob die Reinkulturen übereinstimmten oder verschieden waren. Auf Grund der Untersuchungsergebnisse wurden zunächst zwei Kulturen ausgewählt. Als später durch eine große Anzahl von Versuchen die Identität beider Reinkulturen sichergestellt war, wurde nunmehr mit einer weiter gearbeitet. Um einen Vergleich mit den in Deutschland verbreiteten Brennereihefen zu ermöglichen, wurden gleichzeitig die beiden Rassen II und XII, welche uns von dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin in dankenswerter Weise überlassen worden waren, untersucht. Eine nähere Beschreibung dieser beiden Hefen ist schon von Henneberg[2]) gegeben worden.

B. Morphologie.

I. Sporenbildung.

a) Auf dem Gipsblock. Zunächst sollte entschieden werden, ob die Levure anamite überhaupt ein Saccharomycet ist und welcher Gruppe von Hefen sie angehört.

Dazu wurden Kulturen in gehopfter Bierwürze von 11,5° B verwendet, welche nach wiederholtem Auffrischen in der gleichen Nährlösung während zweier Tage bei 25° C herangezüchtet worden waren. Nach Verlauf dieser Zeit befanden sich die Zellen, wie vorläufige Versuche ergeben hatten, im besten Entwicklungsstadium für die Sporenbildung. Sie hatten dabei auch die größte Glykogenmenge aufgespeichert.

Die Sporenkulturen wurden nach dem üblichen Verfahren auf Gipsblöcken angelegt. Jene wurden bei 25° C aufgestellt und dort 24 Stunden belassen. Nach dieser Zeit waren bereits reife Sporen vorhanden.

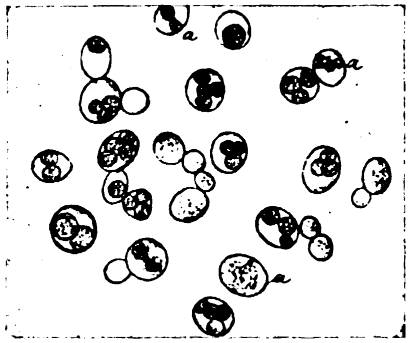


Fig. 1. Reife Sporen nach 20 Stunden bei 25° C. Bei a Sporenanlagen. 540 : 1.

Die Sporen von Levure anamite (Fig. 1) besitzen alle Charaktere der Sporen von wilder Hefe und gleichen den Sporen der beiden Brennereihefen

---

[1]) Hanzawa, Mykol. Centralbl. 1912. Bd. 1. p. 76.

[2]) Henneberg, W., Zeitschr. f. Spirit.-Ind. Bd. 26. 1903. p. 91.

Rasse II und XII. Die Sporenmembran ist glatt und einfach. Die Sporen stimmen hinsichtlich Form und Größe im allgemeinen mit denjenigen der meisten wilden Hefen überein. Die Form ist kugelig. Nur aufgequollene Sporen, die sich innerhalb der Mutterzellmembran gegenseitig drücken, sind wie gewöhnlich an den Berührungsstellen mehr oder weniger abgeplattet. Die Größe bewegt sich innerhalb enger Grenzen und kann, wie auch bei anderen Hefen, in derselben Zelle verschieden sein. Ihre Zahl schwankt zwischen 1 und 4, am häufigsten ist die Zwei- und Dreizahl vertreten. Aus den folgenden Messungen ist die Größe der reifen, nicht aufgequollenen Sporen ersichtlich.

Sporenmutterzelle	Sporen
8,8 : 6,4 µ	4,0 µ
8,0 : 6,4 µ	3,2 µ
7,2 : 6,4 µ	4,0 µund 3,2 µ
8,0 : 6,4 µ	4,0 µ „ 2,4 µ
8,8 : 8,0 µ	4,0 µ, 3,2 µ „ 3,2 µ
9,6 : 6,4 µ	3,2 µ, 3,2 µ, 3,2 µ „ 2,4 µ.

Gewöhnlich sind also die Sporen, wenn sie in größerer Anzahl in einer Zelle ausgebildet werden, etwas kleiner als bei geringerer Zahl. Doch sind auch in der Einzahl vorkommende Sporen oft sehr klein. Hinsichtlich der Zahl der Sporen besteht Übereinstimmung mit Rasse II und XII, dagegen scheinen bei diesen beiden Hefen, wie aus Messungen hervorgeht, die Sporen etwas größer zu sein. Die Zahl der sporenbildenden Zellen ist bei Levure anamite auch bei der für die Sporenbildung günstigsten Temperatur geringer als bei Rasse II und XII.

Nährboden bzw. Nährflüssigkeit	Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
Gehopfte Würzegelatine	—	—	Sporen in mäßiger Zahl
Ungehopfte Würzegelatine	—	—	Ziemlich viel Sporen
Kartoffelwassergelatine.	—	Sporen zahlreich	In den Kratern viel, sonst wenig Sporen
Hefenwassergelatine	—	Auffallend viel Sporen	Sporen zahlreich
Gelbrübenwassergelatine	Vereinzelt Sporen	—	Sporen selten
Weißkrautwassergelatine	—	—	Sporen selten
Weißrübenwassergelatine	—	—	Sporen selten
Kartoffelwasser	—	In der Haut auffallend viele, im Ring zahlreiche Sporen	Im Ring Sporen zahlreich
Gelbrübenwasser	—	Im Ring selten Sporen	—
Hefenwasser + Dextrose + Pepton Witte	— —	—	Im Ring Sporen zahlreich
Mineralische Nährlösung (mit Asparagin) + Dextrose	—	Vereinzelt Sporen	—
Gehopfte Würze (Versuche über Gärungsform)	Vereinzelt Sporen	—	—
Hefenwasser + Laktose (Gärversuche). Hefenring	Wenig Sporen	Sporen zahlreich	Sporen zahlreich

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

b) Auf verschiedenen anderen festen Unterlagen und in Nährflüssigkeiten. Erfahrungsgemäß bilden die Hefen außer auf dem Gipsblocke auch auf anderen festen Unterlagen, wenn die notwendigen Bedingungen erfüllt sind, Sporen. Auch in Nährflüssigkeiten kommt Sporenbildung vor. In der vorstehenden Tabelle sind die festen und flüssigen Nährböden zusammengestellt, in und auf welchen im Laufe der Untersuchungen (Riesenkolonien usw.) Sporenbildung beobachtet wurde. Neben Levure anamite ist auch Rasse II und XII berücksichtigt. Da die Zahl der den Kulturen an verschiedenen Stellen entnommenen mikroskopischen Präparate naturgemäß eine verhältnismäßig geringe war, so vermögen die in der Tabelle zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse zwar kein vollständiges Bild zu bieten, immerhin darf wohl angenommen werden, daß das Sporenbildungsvermögen bei Levure anamite weit weniger ausgeprägt ist, als bei Rasse II und XII.

Sporenkeimung. Der Keimversuch kam in der Weise zur Ausführung, daß sporenhaltige Zellen in gehopfter Würze verteilt und von diesen Tröpfchenkulturen angelegt wurden. Das Sporenmaterial war auf Gipsblöcken bei 25° C während 30 Stunden herangezüchtet worden. Erst nach Verlauf von 22 Stunden konnten bei 25° C die ersten keimenden Sporen beobachtet werden (Fig. 2). Die Keimung erfolgte nach dem ersten Typus (Hansen). In keinem Fall war ein Zerreißen der Mutterzellmembran bei der Keimung festzustellen.

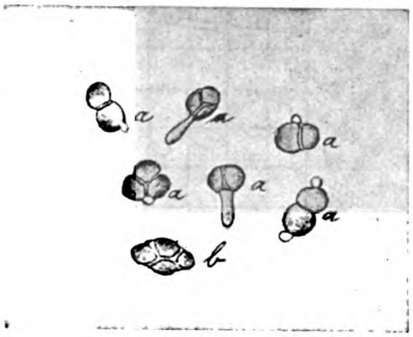


Fig. 2. a. Keimende Sporen in Tröpfchenkulturen mit gehopfter Würze nach 22 Stunden. b. Sporen kurz vor dem Auskeimen. 540 : 1.

Die ersten Sproßzellen haben häufig keimschlauchartige Form, doch treten in älteren, aus Sporen hervorgegangenen Zellkolonien fast nur mehr normale Zellformen auf.

Eine Verschmelzung von zwei Sporen fand nicht statt.

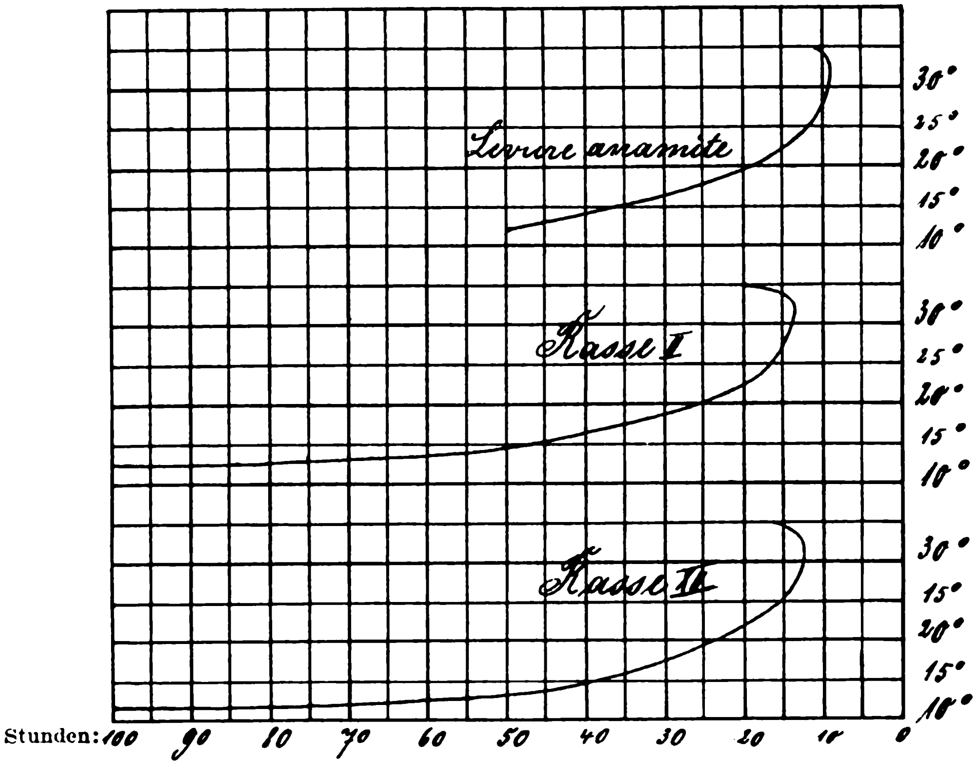
Bei Rasse II und XII keimten die Sporen unter den gleichen Verhältnissen bereits nach 4 Stunden aus. Die Keimung erfolgte gleichfalls nach dem ersten Typus. Hier war ein Platzen der Mutterzellmembran bei Beginn der Keimung öfter zu beobachten. Die zerrissene Zellwand lag dann in Form eines zarten, geschrumpften Häutchens auf oder neben den Sporen. Bei Rasse II keimten die Sporen in einigen Fällen innerhalb der Mutterzellmembran. Die Form der ersten wie auch aller später auftretenden Zellen war bei Rasse XII immer normal (rundlich), während bei Rasse II die ersten Sprosse häufig wie ein Keimschlauch aussahen und in den älteren Kolonien auch langgestreckte, wurstförmige Zellen auftraten. Eine Verschmelzung von zwei Sporen fand auch bei diesen beiden Hefen nicht statt.

Sporenkurve. Die Sporenkurve ist nach allen bisherigen Erfahrungen eines der wichtigsten Unterscheidungsmerkmale der Saccharomyceten.

Zunächst wurde ermittelt, in welchem Alter der Kulturen unter den eingehaltenen Bedingungen die Sporenbildung am frühesten und ausgiebigsten stattfindet. Zu diesem Zweck war die Hefe in gehopfter Bierwürze von 11,5° B. bei 25° C herangezüchtet worden. Nach verschiedenem Alter dieser Kulturen wurden mit der Bodensatzhefe auf vorschriftsmäßig vorbereiteten Gipsblöcken Sporenkulturen angelegt. Am günstigsten war für diese ein Alter der Hefe von 50—55 Stunden. Daher wurde bei allen für die Sporenkurve in Betracht kommenden Kulturen nur 50—55 Stunden alte Hefe benutzt.

Die Tabelle gibt die früheste Zeit für das Auftreten von Sporenanlagen bei den verzeichneten Temperaturen an. Auf Grund dieser Angaben sind die Sporenkurven konstruiert worden.

Temperatur ° C . .	7½°	9°	12°	14°	17°	20°	25°	28°	31°	33°	35°	36°
Levure anamite (Zeit in Stunden) . . .	—	—	55	40	27	19	11	10	9½	9	12	—
Rasse II (Zeit in Stunden)	—	10 Tage	4½ Tage	54	35	26	16	14½	14	13½	20	—
Rasse XII (Zeit in Stunden)	—	8 Tage	3 Tage	46	33	24	15	14	13½	13	17	—



Hinsichtlich der Schnelligkeit der Sporenbildung wird also Levure anamite von keiner der bis jetzt untersuchten Hefen übertroffen. Bei der Optimaltemperatur (33° C) bildet sie noch um 2 Stunden früher Sporen als H. Wills[1]) wilde Hefe No. 811 (Sacch. Willianus Saccardo), bei welcher die ersten Sporenanlagen erst nach 11 Stunden (bei 34° C) auftreten. Damit ist aber Levure anamite wieder als eine typische wilde Hefe charakterisiert. Mit Rasse II und XII, die gleichfalls sehr früh Sporen bilden, hat sie das Optimum (33° C) gemeinsam, dagegen liegt das Minimum höher als bei Rasse II und XII, die in allen Kardinalpunkten der Temperatur übereinstimmen, wobei jedoch die Zeit, nach welcher die ersten Sporenanlagen auftreten, verschieden ist. Daß bei Levure anamite das Minimum nicht so tief liegt, als bei den beiden anderen Hefen, hat vielleicht in deren tropischer Abstammung seinen Grund. Bei 12° C, der unteren Grenze der Sporenbildung von Levure anamite, treten bei Rasse II und besonders bei Rasse XII noch zahlreiche Sporen auf, während diese bei Levure anamite äußerst selten sind. Auch wurde die Beobachtung gemacht, daß an der Maximal- und Minimalgrenze die Sporen fast ausschließlich in der Einzahl in einer Zelle (es gilt dies für alle drei Hefen) auftreten.

---

[1]) Will, H., Zeitschr. ges. Brauwesen Bd. 14. 1891. p. 145.

II. Hautbildung.

Hautbildung, d. h. Entwicklung einer Oberflächenvegetation auf Nährflüssigkeiten ist eine allen Sproßpilzen zukommende Eigenschaft.

Bei der Hautbildung als diagnostisches Merkmal kommen wieder die drei Hauptpunkte der Temperatur in Betracht. In der Natur der Hautbildung ist es jedoch begründet, daß der Zeitraum, innerhalb welchen bei der gleichen Temperatur jene bei der gleichen Art erfolgt, sich innerhalb viel weiterer Grenzen als bei der Sporenbildung bewegt. Die Kurve für die Hautbildung hat dementsprechend als diagnostisches Merkmal weniger Wert als die Sporenkurve. Sie ist deshalb hier nicht weiter berücksichtigt worden. Größeren Wert besitzt der Typus, nach welchem die Hautbildung erfolgt und die morphologischen Erscheinungen, welche dabei auftreten. Die Hautkulturen wurden in der üblichen Weise in 300 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben mit gehopfter Würze von 11,5° B. (Würzeschicht 2,5 cm hoch) angelegt. Die Kulturen blieben bei ca. 20° C an einem ruhigen Platz stehen.

Nach ungefähr 8 Tagen zeigten sich auf der Flüssigkeitsoberfläche die ersten Hefeninselchen, die anfangs wenig deutlich erschienen, aber rasch wuchsen und sich dabei in scharf umgrenzte, stark hervortretende weißliche Flecke von trockener Beschaffenheit umwandelten (Hautinselchen). Bei 52facher Vergrößerung ließ die Oberfläche der scharf begrenzten Hautinselchen infolge radialer Anordnung der Zellen teils einen regelmäßigen Aufbau erkennen, teils erschienen die Hautinselchen unregelmäßig (mehr oder weniger flockig). In einigen Fällen boten die Inselchen schon dem unbewaffneten Auge das Bild kleiner Riesenkolonien dar. Die Hautinselchen, die anfangs einzeln und verteilt auf der Flüssigkeitsoberfläche lagen, schlossen sich früher oder später zu einer Haut zusammen, welche manchmal die ganze Flüssigkeitsoberfläche, manchmal nur einen Teil von dieser bedeckte. Innerhalb der Haut erschienen die einzelnen Hefeninselchen häufig noch deutlich umgrenzt. Die junge Haut hält sich gut auf der Flüssigkeitsoberfläche. In älteren Kulturen wird sie mehr oder weniger schleimig, wächst merklich in die Dicke und sinkt in kleineren Partikeln leicht zu Boden, hat also nicht mehr den festen Zusammenhalt wie die junge Haut. Sie läßt ein sehr feines, glänzendes, die Flüssigkeitsoberfläche überziehendes Häutchen zurück. In diesem Stadium der Hautbildung ist auch ein mäßig stark entwickelter Hefenring vorhanden. Die Hautbildung erfolgt also nach dem Typus II a, wie bei den meisten Saccharomyceten.

Die Hautinselchen bestanden hauptsächlich aus Zellen (Fig. 3), wie sie sich in der Nährflüssigkeit entwickelt und die Gärung hervorgerufen hatten,

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

neben kleinen ovalen Zellen, die in ihrer späteren Nachkommenschaft auch Wurstform annehmen können („erste Generation der echten Hautzellen“). Solche wurstförmigen Zellen sind in den Hautinselchen von Levure anamite in mäßiger Zahl vorhanden und nur ganz selten zu ausgedehnten Sproßverbänden vereinigt. Ihre Größe bewegt sich meist zwischen 9,0 : 4,5 μ. Länger als 12,8 : 4,0 μ sind sie nicht. Auch die übrigen Zellformen zeigen keine große Neigung zur Bildung von Sproßverbänden. Kronenbildung, eine in in den Hautkulturen häufig auftretende Art der Sprossung, konnte bei Levure anamite nur in einzelnen Fällen beobachtet werden. In 2 Monate alten Kulturen mit geschlossenem Ring und schleimiger Haut traten viele Zellen auf, die das Aussehen von Dauerzellen hatten. Auch typische Dauerzellen, aber nur in geringer Zahl, kamen vor. Das feine Häutchen, das nach dem Sinken der dickeren Haut auf der Flüssigkeitsoberfläche zurückbleibt, besteht zum größten Teil aus derartigen Dauerzellen ähnlichen Zellen. Die langgestreckten, wurstförmigen Zellen scheinen nicht mehr so zahlreich zu sein, wie in jungen Hautkulturen. Drei Monate alte Kulturen enthielten noch mehr typische Dauerzellen. Sproßverbände derber, langgestreckter Zellen („zweite Generation der echten Hautzellen“), wie sie in älteren Kulturen der meisten Saccharomyceten auftreten, konnten selbst in 3 Monate alten Kulturen von Levure anamite nicht beobachtet werden.

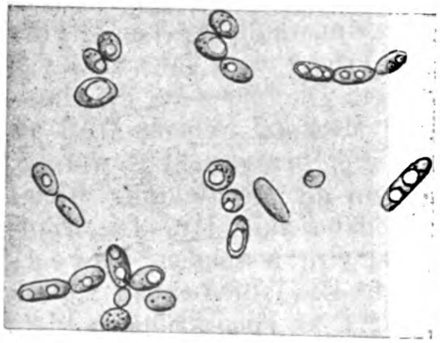


Fig. 3. Zellen aus den Hautinselchen einer 2 Wochen alten Würzekultur. 540 : 1.

Im Vergleich zu Levure anamite sind bei Rasse XII die Hefeninselchen weniger scharf umgrenzt und innerhalb der eben geschlossenen Haut nicht mehr als solche zu erkennen, sie verschmelzen also leichter. Bei 52-facher Vergrößerung zeigen sie sehr häufig eine scharf ausgeprägte, radiale Anordnung der Zellen, die manchmal bis zur Mitte der Hautinselchen deutlich zu verfolgen war. Rasse XII bildet eine mattglänzende Haut, die sehr leicht zu Boden sinkt, wobei sie sich in größere Flocken zerteilt. Die Haut ist, besonders in älteren Kulturen, dicker als bei Levure anamite. Auch der Ring zeigt bei dieser Hefe eine kräftigere Entwicklung.

Die Hautinselchen von Rasse XII sind vor allem ausgezeichnet durch das Auftreten sehr zahlreicher, mycelartig sich ausbreitender Sproßverbände ovaler bis langgestreckter, wurstförmiger Zellen, die sehr fest zusammenhängen. Ihre Größe bewegt sich meist um 11,9 : 4,4 μ, doch kommen auch Zellen bis zu 19,2 : 3,2 μ Größe vor, sind also merklich länger als bei Levure anamite. In 3 Monate alten Hautkulturen traten neben Dauerzellen, besonders in der Haut, weniger im Ring, wurstförmige, manchmal auch keulen- bis bisquittförmige Zellen auf, die zu ausgedehnten Sproßverbänden vereinigt waren. Sie sahen den Zellen der „ersten Hautgeneration“ sehr ähnlich, waren jedoch im allgemeinen dicker (meist zwischen 10 : 4 μ und 8 : 3,5 μ groß) und stärker granuliert als diese; auch besaßen sie eine stärkere Wandung. Sie reagierten meist deutlich, manchmal sogar recht kräftig auf Glykogen.

Die Hautinselchen von Rasse II sind meist unregelmäßig zusammengesetzt und bilden eine ziemlich dünne, mattglänzende Haut, die gleichfalls sehr leicht zu Boden sinkt, dabei aber in sehr feine Teilchen zerfällt („Staubhaut"). Auch in den Hautinselchen von Rasse II kommen ausgedehnte Sproßverbände länglich ovaler bis langgestreckter wurstförmiger Zellen vor, doch sind sie nicht so häufig und ausgeprägt wie bei Rasse XII. Die Größe dieser Zellen ist im Mittel 14,0 : 5,2 μ, es treten aber Zellen von einer Größe bis zu 27,2 : 6,4 μ auf, also noch bedeutend längere als bei Rasse XII. In 3 Monate alten Kulturen, in denen auch ein mäßig starker Hautring sich gebildet hatte, waren ziemlich viel Dauerzellen mit ziemlich kräftiger Glykogenreaktion zu finden. Wurstförmige Zellen konnten im Ring und in der Haut selbst nur wenige gefunden werden, doch waren sie im Bodensatz (wahrscheinlich von zu Boden gesunkenen Hautteilchen herrührend) ziemlich zahlreich vorhanden. Die Größe dieser Zellen, die auch häufig zur Keulenform übergingen, schwankte meist zwischen 12 : 3 und 9 : 2,5 μ. Wahrscheinlich bilden also Rasse II und XII eine „zweite Hautgeneration".

Hinsichtlich der Schnelligkeit der Hautbildung steht Levure anamite zwischen Rasse II und XII. Sie zeigte bei 25° C nach 7 Tagen die ersten Anfänge der Haut, d. h. es traten in den Hefeninselchen zuerst Zellen der „ersten Hautgeneration" auf. Das Optimum liegt bei 31° C (6 Tage). Bei Rasse XII begann die Hautbildung bei 25° C zwar auch erst am 7. Tage, doch wurden die Unterschiede bei höherer Temperatur ganz beträchtlich, so bei 35° C, wo Levure anamite nach 8 Tagen, Rasse XII bereits nach 2½ Tagen die ersten Anzeichen einer Hautbildung aufwies. Bei Rasse II sind die entsprechenden Zeiten bei 25° C 9 Tage und bei 35° C 8 Tage. Bemerkenswert ist, daß bei höherer Temperatur (35° C) die Haut von Levure anamite (auch die von Rasse II) nur mehr einen geringen Teil der Flüssigkeitsoberfläche bedeckte, während sie bei Rasse XII noch vollständig ausgebildet war. Auch konnte, besonders bei höherer Temperatur, beobachtet werden, wie vor dem Erscheinen der Zellen der „ersten Hautgeneration" langgestreckte, aber abnorm geformte Zellen auftraten (am häufigsten bei Rasse II), die für den Beginn der Hautbildung nicht herangezogen werden dürfen. Es handelt sich hier sehr wahrscheinlich um Zellen der Gärungsform, für welche die Existenzbedingungen ungünstig wurden. Die „erste Generation der Hautzellen" wird gewöhnlich erst einen Tag später gebildet.

III. Wachstumserscheinungen in Nährflüssigkeiten und auf festen Nährböden.

1. Wachstumserscheinungen in Nährflüssigkeiten.

a) Tröpfchenkulturen. Die Tröpfchenkulturen wurden mit acht verschiedenen Nährflüssigkeiten angefertigt und zwar mit gehopfter Würze (11—12° B.), ungehopfter Würze (11—12° B.), Kartoffelwasser, Gelbrübenwasser, Weißkrautwasser, Weißrübenwasser, Hefenwasser + Saccharose und Hefenwasser + Dextrose. Es sei im voraus bemerkt, daß sowohl die Art der Sprossung als auch der Charakter der Kolonien in allen Nährlösungen übereinstimmte; es gilt also die folgende Beschreibung der Wachstumserscheinungen in den Tröpfchenkulturen mit gehopfter Würze auch für die übrigen Nährflüssigkeiten.

Levure anamite sproßt in der allgemein bekannten Weise aus, indem meist an einem der beiden Pole der Mutterzelle die junge Tochterzelle angelegt wird. Selten entstehen an einem der beiden Pole gleichzeitig zwei

Sprosse. In einigen Fällen waren die Tochterzellen seitlich an der Mutterzelle entstanden. 5 Stunden alte Sproßverbände (bei 25° C) bestanden aus Zellen mit sehr schwach lichtbrechendem Inhalte, der äußerst feinkörnig erschien. Vakuolen waren nicht oder nur schwer zu erkennen. Nach 25 Stunden machten die Kolonien nach den Erscheinungen in den Zellen den Eindruck derjenigen einer typischen wilden Hefe. Nur am Rande der Kolonien waren noch Sproßverbände vorhanden. Riesenzellen, die stärker granuliert waren und meist sehr große Vakuolen besaßen, konnten öfter beobachtet werden. Einige Wochen alte Kolonien zeigten im optischen Querschnitt meist regelmäßige, rundliche Form.

Von der Rasse II gilt hinsichtlich der Wachstumserscheinungen (nur in gehopfter Würze beobachtet) im allgemeinen dasselbe wie von Levure anamite. Rasse II macht gleichfalls den Eindruck einer typischen wilden Hefe. Die Sproßverbände sind locker und fallen bald auseinander. Auch in den Kolonien von Rasse II kommen Riesenzellen vor. Rasse XII dagegen weist gegenüber Levure anamite und Rasse II merkliche Verschiedenheiten auf. Die Art der Sprossung ist dieselbe, jedoch sind die Sproßverbände viel ausgedehnter als bei den beiden anderen Hefen. Dann sind die Zellen von Rasse XII stärker granuliert und die Kolonien erinnern eher an Kultur- als an wilde Hefe. Riesenzellen treten auch in den Kolonien von Rasse XII auf.

b) Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeiten. Durch diese Versuchsreihe sollte festgestellt werden: 1. ob sich die Hefe in den benutzten Nährflüssigkeiten überhaupt entwickelt und ob dabei irgend welche charakteristische Erscheinungen auftreten, welche als diagnostische Merkmale (äußere Wachstumserscheinungen, Form und Größe der Zellen usw.) benutzt werden können. 2. Welche Nährlösung nach ihrer Zusammensetzung für das Wachstum am günstigsten ist.

Die verwendeten Nährlösungen waren dieselben wie bei den Tröpfchenkulturen. Sie wurden in Mengen von je 30 ccm in kleine Erlenmeyer-Kölbchen abgefüllt und mit je einer Platinöse Bodensatzhefe einer Kultur von Levure anamite geimpft. Die Kulturen blieben bei Zimmertemperatur (ca. 20° C) 4 Wochen lang stehen. Zur Ergänzung der Beobachtungen wurden auch noch die mineralischen Nährflüssigkeiten mit Zuckerzusatz bei den Assimilationsversuchen (s. später) herangezogen.

Bereits am ersten Tag nach der Beimpfung zeigte sich in sämtlichen Nährflüssigkeiten Entwicklung. Schwache bis deutliche Gärungserscheinungen konnten nur in den beiden Bierwürzen, ferner in Weißkraut- und Weißrübenwasser beobachtet werden. Bei Abschluß des Versuches (nach 4 Wochen) war weder in der Stärke der Entwicklung noch in irgendeiner anderen äußeren Erscheinung ein merklicher Unterschied zwischen den einzelnen Nährflüssigkeiten festzustellen. Die Absätze waren fast überall gleich kräftig (ziemlich stark bis stark). Ring- und Hautbildung erfolgte in den beiden Würzen sowie in Weißrübenwasser. Dieses verbreitete, besonders während der Gärung, einen intensiven Geruch nach Schwefelkohlenstoff. Ring-, aber keine Hautbildung trat bei Kartoffel- und Weißkrautwasser auf; der Ring war besonders in letzteren kräftig entwickelt. In den für die Assimilationsversuche verwendeten Zuckerlösungen traten außer Absätzen keine augenfälligen äußeren Erscheinungen auf. Die Bildung der Absätze ging in den mineralischen Nährflüssigkeiten langsamer vor sich als in den übrigen

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Nährflüssigkeiten, wo sie schon am dritten Tage ihre endgültige Stärke erreicht hatten. Naturgemäß war die Entwicklung in den Zuckerlösungen außerdem eine verhältnismäßig viel geringere.

Die Gestalt der Zellen in einer jungen Kultur von Levure anamite ist in Würze von 11—12° B. kugelförmig oder oval (Fig. 4). Die Kugelform ist meist unter den kleinen Zellen vertreten. Die Zellgröße unterliegt starken Schwankungen und bewegt sich zwischen 4,0 : 4,0 μ und 11,2 : 9,6 μ. Vorherrschend sind Zellen von 7,5 : 6,7 μ. Riesenzellen kommen öfters vor. Die Zellwand ist von normaler Dicke. Das Lichtbrechungsvermögen des Plasmas stimmt im allgemeinen mit demjenigen der bisher bekannten wilden Hefen überein. Granula sind nur wenige vorhanden, auch sind sie nicht besonders deutlich sichtbar. Die Riesenzellen enthalten meist sehr große Vakuolen. Am häufigsten sind die Zellen einzeln, selten zu größeren als vierzelligen Sproßverbänden vereinigt. Levure anamite zeigt also auch unter diesen Umständen den Charakter einer wilden Hefe. (Ähnliche morphologische Eigenschaften der Hefe treten auch in frisch vergorener Maische auf.) In 4 Wochen alten Würzekulturen bsetand die Bodensatzhefe hauptsächlich aus den beschriebenen Zellformen im Hungerzustande. Auffällig waren zahlreiche Riesenzellen.

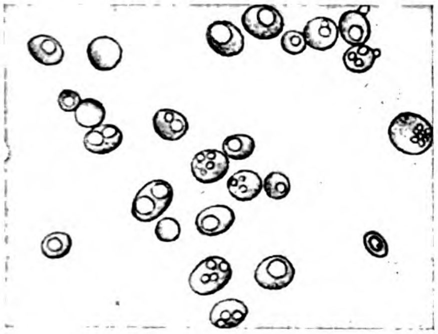


Fig. 4. Zellen aus einer 8 Tage alten Kultur in gehopfter Würze bei 25° C. 540 : 1.

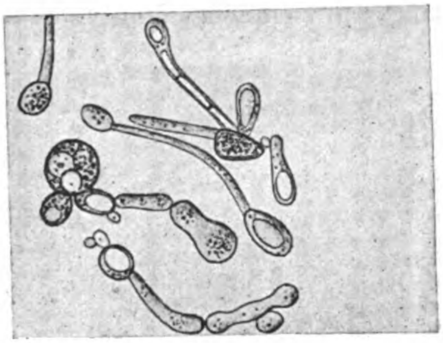


Fig. 5. Zellen aus dem Hefenring einer 2 Monate alten Kultur in Kartoffelwasser bei 20—24° C. 540 : 1.

Die Bodensatzhefe in den übrigen Nährflüssigkeiten stimmte mit derjenigen in Würze überein.

Langgestreckte wurstförmige Zellen, von zu Boden gesunkenen Hautteilchen herrührend, kamen überall in geringerer oder größerer Anzahl vor.

Die Haut und der Ring der Würzekulturen waren aus den früher beschriebenen Zellformen zusammengesetzt. Abweichend von jenen traten im Hefenring von Kartoffelwasserkulturen sehr viele rundliche Zellen mit scharf ausgeprägter Kronenbildung und zahlreiche abnorme Zellformen auf (Fig. 5). So beobachtete man keimschlauchartige Auswüchse von 64 μ und mehr Länge sowie keulenförmige, durch Querwände geteilte Zellen, wie sie bei der Keimung von Dauerzellen auftreten. Typische und reichliche Kronenbildung wurde auch im Hefenring von Weißkrautwasser festgestellt. Abnorme Zellformen waren hier seltener. Bei Weißrübenwasser wies besonders der Ring typische Kronenbildung auf. Abnorme Zellen, wie lange, keimschlauchartige Auswüchse, konnten besonders in der Haut öfter angetroffen werden.

Die Zahl der toten Zellen war am größten in Kartoffelwasser und Weißkrautwasser. Im Zusammenhalt mit den abnormen Zellformen erscheinen also diese Nährböden für Levure anamite weniger geeignet als die übrigen.

In den Bodensätzen der mineralischen Nährlösungen traten vor allem zahlreiche rundliche Zellen mit typischer Kronenbildung auf. Etwas seltener war diese in den Laktose- und Raffinoselösungen.

Die Sprossung mit Kronenbildung scheint wesentlich durch die Nährlösung bedingt zu sein.

Die äußeren Wachstumserscheinungen von Rasse II und XII stimmen im allgemeinen mit denjenigen der Levure anamite überein.

2. Wachstumserscheinungen in und auf festen Nährböden.

a) Einzellkulturen. Die bei 19° C während 4 Tage in 10proz. gehopfter Würzegelatine gewachsenen Kolonien gehörten fast ausschließlich dem Typus II, „unregelmäßige Kolonien mit regelmäßigem Kern"[1]), an. Maulbeerform, Typus I, seltener.

b) Stichkulturen. Die Stichkulturen in gehopfter 10proz. Würzegelatine zeigten keine besonderen Wachstumserscheinungen. Die Hefe verträgt ein ziemliches Maß von Luftbeschränkung. In 3 Monate alten, bereits verflüssigten Stichkulturen traten langgestreckte, wurstförmige Zellen neben Dauerzellen ähnlichen Riesenzellen (Fig. 6 u. 7) auf. Typische Dauerzellen waren selten.

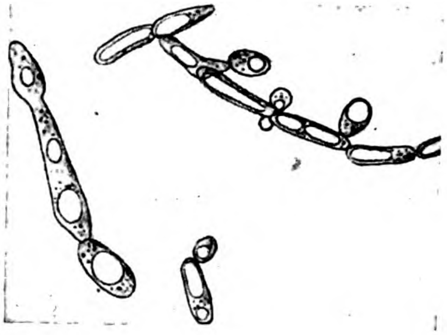


Fig. 6.

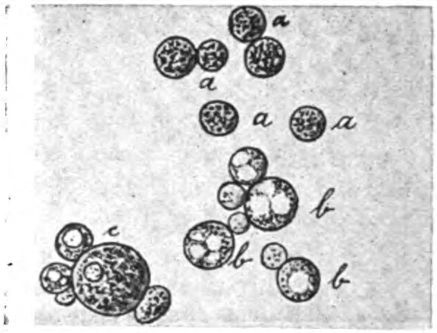


Fig. 7.

Zellen aus einer 3½ Monate alten, bei 18° verflüssigten Stichkultur in gehopfter 10proz. Würzegelatine. a. Typische Dauerzellen. b. Dauerzellen-ähnlicheZellen. c. Riesenzelle mit Kronenbildung. 540: 1.

Für die Stichkulturen von Rasse II und XII gilt das gleiche wie für die von Levure anamite.

c) Kulturen mit gleichmäßiger Verteilung der Hefe. Auch diese, in 10proz. gehopfter Würzegelatine angelegten Kulturen bewiesen, daß Levure anamite ein ziemliches Maß von Luftbeschränkung verträgt.

Rasse II und XII stimmten auch in diesem Falle mit Levure anamite vollkommen überein.

d) Riesenkolonien. Diese wurden nach dem allgemein üblichen Verfahren auf gehopfter und ungehopfter Würzegelatine, Kartoffelwasser-, Gelbrübenwasser-, Weißkrautwasser-, Weißrübenwasser- und Hefenwassergelatine angelegt. Alle Nährböden enthielten 10 Proz. Gelatine. Beobachtungstemperatur 20° C, 14° C und 9° C.

---

[1]) Vergl. H. Will, Anleitung usw. p. 83.

Bezüglich der Einzelbeobachtungen an den Riesenkolonien auf den verschiedenen Nährböden sei auf die Dissertation des Herrn Heinrich verwiesen. Kurz seien nur die Beobachtungen über die Wachstumserscheinungen der Riesenkolonien im Höhepunkt der Entwicklung auf gehopfter und ungehopfter Würzegelatine mitgeteilt; im übrigen geben die Abbildungen 8—15 Aufschluß über die verschiedenen Wachstumsformen.

Riesenkolonien von Levure anamite. Natürliche Größe.

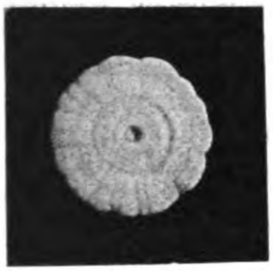


Fig. 8.

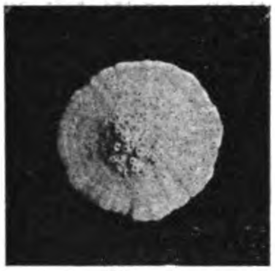


Fig. 9.

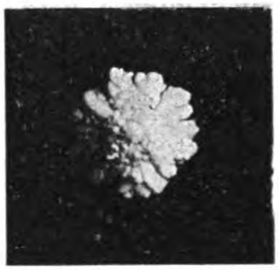


Fig. 10.

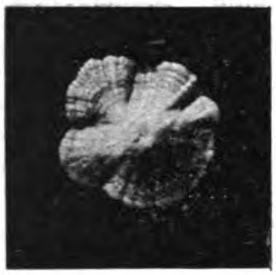


Fig. 11.

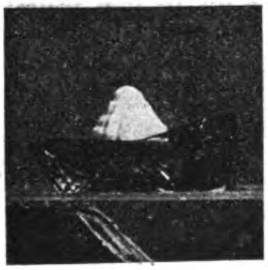


Fig. 12.

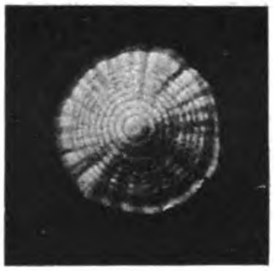


Fig. 13.

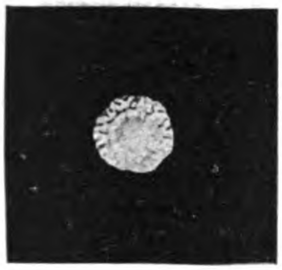


Fig. 14.

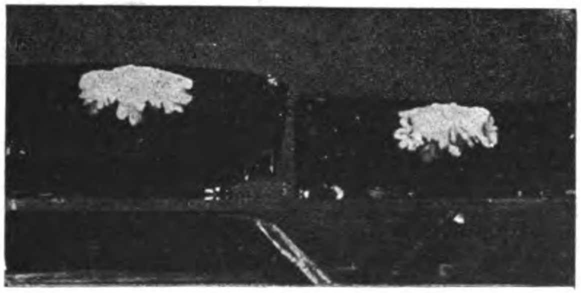


Fig. 15.

Fig. 8. Ungehopfte Würzegelatine bei 20° C. Alter: 5 Wochen.
Fig. 9. Gelbrübenwassergelatine bei 20° C. Alter: 5 Wochen.
Fig. 10. Weißrübenwassergelatine bei 20° C. Alter: 5 Wochen.
Fig. 11. Weißrübenwassergelatine bei 14° C. Alter: 10 Wochen.
Fig. 12. Weißrübenwassergelatine bei 9° C. Alter: 3 Monate.
Fig. 13. Weißkrautwassergelatine bei 14° C. Alter: 10 Wochen.
Fig. 14. Hefenwassergelatine bei 20° C. Alter: 5 Wochen.
Fig. 15. Weißkrautwassergelatine bei 20° C. Alter: 5 Wochen, senkrechter Schnitt durch die Riesenkolonie; die äußerst kräftig entwickelten Anhänge der Unterseite sehr deutlich.

20° C. Nach 4 Wochen: Oberflächenbelag flach ausgebreitet, zentrale Partie eingesenkt und glatt. Strombildung mehr oder minder scharf ausgeprägt. Anhänge auf der Unterseite ziemlich kräftig. Oberfläche matt. Hefenfarbe. Durchmesser der Kolonien 18—19 mm.

14° C. Nach 10 Wochen: Ähnlich wie bei 20° C, jedoch schwach gewölbt. Anhänge schwach entwickelt. Durchmesser 18—19 μ.

9° C. Nach 10 Wochen: Ähnlich wie bei 20° C, jedoch stark in die Höhe gewachsen. Durchmesser unten 8 mm, oben 4,5 mm, Höhe 4 mm.

Die äußeren Wachstumserscheinungen der Riesenkolonien (Anhänge und Strombildung) weisen, wenn sich auch auf den verschiedenen Nährböden Unterschiede geltend machen im allgemeinen die Charaktere der Grundform I a auf[1]). Die Unterschiede auf den verschiedenen Nährböden sind, wie schon bei anderen Gelegenheiten betont wurde, nicht prinzipielle, sondern nur graduelle. Strombildung war bei einzelnen Kolonien, besonders bei denjenigen auf Hefenwassergelatine, nicht deutlich sichtbar. Daß aber auch in diesem Falle das Wachstum nach der Grundform I a erfolgte, ging aus dem Verlaufe des Wachstums sowie aus dem Auftreten sichtbarer Anhänge an den bei 14° C gewachsenen Kolonien hervor. Am kräftigsten waren die Anhänge in Weißkraut- und Weißrübenwassergelatine; demgemäß war hier auch die Strombildung sehr scharf ausgeprägt, d. h. die Ströme waren viel deutlicher von einander getrennt als in den übrigen Kolonien. Bemerkenswert ist die Bildung von „Kratern“ in den Kolonien auf Gelbrübenwassergelatine. Alle bei 9° C gewachsenen Kolonien waren hart, trocken und brüchig, bei 20° C zeigten sie ziemlich weiche Beschaffenheit und besaßen öfter einen matten Glanz. Die Schnelligkeit des Wachstums war, soweit dies nach der Zunahme des Durchmessers der Riesenkolonien beurteilt zu werden vermag, auf allen Nährböden ziemlich gleich. Nur Hefenwassergelatine war ein ungünstiger Nährboden, denn der Durchmesser der Kolonien blieb weit hinter demjenigen der übrigen zurück.

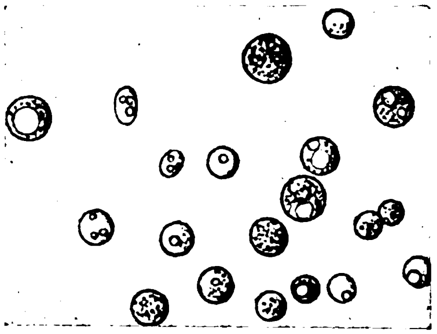


Fig. 16. 4 Wochen alte Riesenkolonie auf gehopfter Würzegelatine bei 20° C. Zellen aus der zentralen Partie. 540 : 1.

Während der Oberflächenbelag der Riesenkolonien bei den höheren Temperaturen mehr oder weniger flach ausgebreitet erscheint, wachsen die Kolonien bei niederer Temperatur mehr in die Höhe. Es ist dies eine ganz allgemeine Erscheinung. Beachtenswert ist dagegen im vorliegenden Falle die dachziegelartige Übereinanderlagerung konzentrischer Streifen.

Was die in den Riesenkolonien von Levure anamite auftretenden Zellformen betrifft, so besteht eine gewisse Übereinstimmung mit den Zellformen der Hautinselchen. Es bilden sich nämlich in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, welche an den Riesenkolonien anderer Saccharomyceten gemacht wurden, im Laufe des Wachstums ähnlich wie bei der Hautbildung, Zellgenerationen (hauptsächlich langgestreckte, wurstförmige Zellen), die in der ausgesäten Hefe nicht vorhanden waren. Diese Zellen, in erster Linie die wurstförmigen, sind für die Gestaltung der Riesenkolonien von entscheidendem Einfluß.

In der zentralen Partie der Riesenkolonien herrschten auf fast allen Nährböden starkwandige und stark granulierte, rundliche bis ovale, manchmal auch anders geformte Zellen (Fig. 16) vor, die sehr an Dauerzellen erinnerten, in einzelnen Fällen sicher auch Dauerzellen waren. Bemerkenswert ist, daß die „Krater“ zum großen Teile aus dauerzellenähnlichen Zellen zusammengesetzt waren. In der zentralen Partie der Kolonien auf Weißkraut- und Weißrübenwassergelatine traten langgestreckte, meist abnorme Zellformen in den Vordergrund.

---

[1]) Vgl. Will, H., Anleitung usw. p. 108.

In der Randpartie der Kolonien fanden sich neben rundlichen und ovalen auch viele langgestreckte Zellen, wie in den Anhängen (Fig. 17). Die Zellen der Randpartie waren im allgemeinen merklich schwächer granuliert als die in der zentralen Partie. Auf Hefenwassergelatine, wo keine oder nur Spuren von Anhängen vorhanden waren, fehlten die langgestreckten Zellen in der Randpartie; diese war fast aus den gleichen Zellformen wie die zentrale Partie zusammengesetzt. Infolgedessen fehlte Strombildung. Bei Weißkraut- und Weißrübenwassergelatine war auch in der Randpartie die Zahl der abnorm geformten Zellen groß. Die Anhänge der Riesenkolonien bestanden fast ausschließlich aus weit sich ausbreitenden Sproßverbänden langgestreckter, wurstförmiger Zellen, die kaum granuliert waren (Fig. 18).

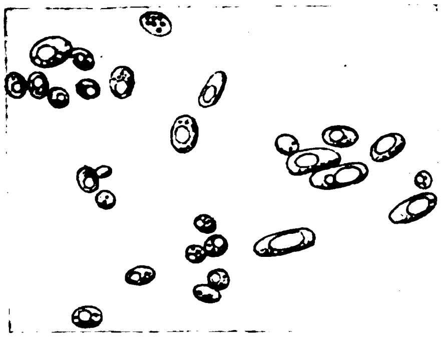


Fig. 17. 4 Wochen alte Riesenkolonie auf gehopfter Würzegelatine. Zellen aus der Randpartie. 540 : 1.

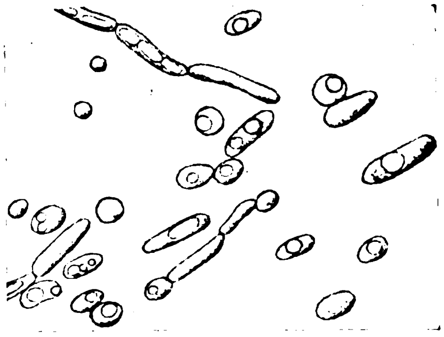


Fig. 18. 4 Wochen alte Riesenkolonie auf gehopfter Würzegelatine bei 20° C. Zellen aus den Anhängen. 540 : 1.

Die Riesenkolonien von Rasse II gehören gleichfalls dem Typus I a an. Die auf gehopfter Würzegelatine gewachsenen Kolonien haben große Ähnlichkeit mit denjenigen von Levure anamite.

Rasse XII dagegen bildet Riesenkolonien vom Typus I b. Sie unterscheiden sich von denjenigen der Levure anamite und Rasse II sehr deutlich. Vor allem sind bei jenen Kolonien die Ströme geteilt und scharf von einander getrennt, sowie kräftig entwickelt. Die Oberfläche aller Kolonien zeigt zahlreiche Unebenheiten (Faltungen und Kräuselungen). Die Riesenkolonien auf Würzegelatine haben die größte Ähnlichkeit mit denjenigen der untergärigen Bierhefe Stamm 6[1]). In anatomischer Hinsicht stimmen die Riesenkolonien sowohl von Rasse XII als auch von Rasse II mit denjenigen der meisten übrigen Saccharomyceten überein.

C. Physiologie.

I. Generationsdauer.

Als Generationsdauer bei Bakterien ist die Zeitdauer, binnen welcher aus einer Bakterienzelle eine zweite (also eine neue Generation) hervorgeht, bezeichnet worden. Bestimmter wäre eine auf Grund der Untersuchungen von Brefeld[1]) und Prazmowski[2]) an dem Heubazillus gegebene Definition: Unter Generationsdauer hat man jene Zeit zu verstehen, innerhalb welcher ein aus der Teilung eines längeren Stäbchens hervorgegangenes Teilstäbchen so lange heranwächst, bis es sich wieder teilt. Auf Sproßpilze übertragen, müßte die Definition folgendermaßen lauten: Generationsdauer ist diejenige Zeit, welche vom Beginn der Sprossung, durch welche eine neue Zelle angelegt wird, bis zu dem Zeitpunkt verstreicht, wo die inzwischen mehr oder weniger herangewachsene Zelle befähigt wird, selbst eine Tochterzelle zu bilden. Hoyer[3]), der mit verschiedenen Hefenrassen in dieser Richtung Versuche machte, geht von der Bedingung aus, daß die Sprossung der Hefe immer eine zweiteilige und nicht etwa eine drei- oder mehrteilige sei, d. h., daß aus einer Zelle nach einer bestimmten Zeit immer nur wieder eine neue Zelle hervorgehe. Das trifft auch für Levure anamite in den meisten Fällen zu.

---

[1]) Vergl. Will, H., Anleitung usw. Taf. I. Fig. 3.

Die Versuche über die Generationsdauer der Levure anamite wurden abweichend von Hoyer und Zikes[4]) folgendermaßen ausgeführt.

Mit 18 Stunden alter Bodensatzhefe wurden nach genügender Verdünnung in gehopfter Würze Adhäsionskulturen in der Weise angelegt, daß die einzelnen Zellen ziemlich weit auseinander lagen. Man brachte hierauf die Kulturen in den Thermostaten zu 26° C. Nach ca. 1—2 Stunden waren genug Zellen vorhanden, die gerade die ersten Sprossungserscheinungen zeigten. Diese Zellen, und zwar nur solche mit je einer neu angelegten Zelle, wurden mittels eines Markierers bezeichnet und die Kulturen hierauf wieder zu 26° C gebracht. Nach einer bestimmten Zeit zählte man die neu entstandenen ausgewachsenen Zellen. Die Generationsdauer wurde berechnet nach der Formel

$$M = 2^{\frac{t}{x}} \text{ oder } x = \frac{\log.\ 2\,t}{\log.\ M},$$

wo t die Zeitdauer des Versuches vom Aussprossen der Zellen an gerechnet, M die Zahl der im Durchschnitt aus einer Zelle gewachsenen Zellen und x die gesuchte Generationsdauer ist. (Rasse II und XII sind mit untersucht.)

Hefe	Temperatur	Versuchsdauer Sdt.	Aus einer Zelle gewachsen	Im Durchschnitt aus einer Zelle	Generationsdauer
Levure anamite	26° C	8	14, 14, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 16, 24	16	2 Stunden
Rasse II	26° C	6½	13, 13, 14, 15, 15, 15, 16, 16, 16, 17, 17, 18	15,4	1 St. 39 Min.
Rasse XII	26° C	6½	8, 9, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 16, 16, 16	13,6	1 „ 43 „

---

[1]) Brefeld, Abhandl. d. Gesellsch. naturf. Freunde in Berlin. 19. Febr. 1878. Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze H. 4. 1881. p. 36.

[2]) Prazmowski, Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. Leipzig 1880.

[3]) Hoyer, H., Allg. Zeitschr. f. Bierb. u. Malzfab. Bd. 28. 1900. p. 37.

[4]) Zikes, ebenda Bd. 41. p. 86.

II. Gärversuche.

1. Kleingärmethode.

Geprüft wurden folgende Zuckerarten: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Laktose, Maltose und Raffinose. Das Aussaatmaterial war auf 10proz., schräg erstarrter, gehopfter Würzegelatine bei ca. 20° C herangezüchtet worden und 5 Tage alt. Als Grundlösung diente neutrales Hefenwasser. Die Kulturen wurden bei 25° C aufgestellt, dort eine Woche lang belassen und während dieser Zeit täglich beobachtet. Das Ergebnis des Versuches ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt (unter Berücksichtigung der Rasse II und XII).

Hefe	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Laktose	Maltose	Raffinose	Blinder Versuch
Levure anamite	$+^1, +^1$	$+^1, +^1$	$+^2, +^2$	$+^1, +^1$	—,—	$+^4, +^4$	$+^2, +^2$	—,—
Rasse II	$+^1, +^1$	$+^1, +^1$	$+^2, +^2$	$+^1, +^1$	—,—	$+^1, +^1$	$+^2, +^2$	—,—
Rasse XII	$+^1, +^1$	$+^1, +^1$	$+^2, +^2$	$+^1, +^1$	—,—	$+^1, +^1$	$+^2, +^2$	—,—

In dieser Tabelle bedeutet + = Vergärung, — = keine Vergärung. Das zweite + bezw. — bezeichnet das Ergebnis des Parallelversuches. Die dem +-Zeichen beigesetzten Exponenten bezeichnen den Grad der Vergärung und zwar bedeutet: $+^1$ = starke Gärung (nach 24 Stunden ist der ganze Hohlraum des Objektträgers von einer Kohlensäureblase erfüllt), $+^2$ = mäßige Gärung (die Blase füllt nur ungefähr die Hälfte der Höhlung aus), $+^3$ = geringe Gärung (hier nicht aufgetreten; nach 24 Stunden nur sehr kleine Blasen), $+^4$ = sehr geringe Gärung (nach wenigstens 4 Tagen Gasblasen).

Levure anamite vergärt also, mit Ausnahme von Milchzucker sämtliche geprüften Zucker. Maltose wird sehr träge vergoren (in einem Versuch traten am dritten Tage Gasblasen auf). Rasse II und XII vergären ebenfalls alle geprüften Zucker außer Laktose, jedoch wird von ihnen die Maltose viel energischer angegriffen, am stärksten von Rasse II.

2. Gärversuch im Großen mit Milchzucker.

Hierzu wurde neutrales Hefenwasser mit 6 Proz. chemisch reinem Milchzucker versetzt und in Mengen von je 100 ccm in Erlenmeyer-Kolben abgefüllt. Das 8 Tage alte Aussaatmaterial war, wie bei der Kleingärmethode, auf festem Nährboden herangezüchtet worden. Man trug davon je zwei erbsengroße Mengen in die Zuckerlösung ein. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur (ca. 20° C) aufgestellt und nach einem Monat abgeschlossen. Während dieser Zeit zeigten sich keine sichtbaren Gärungserscheinungen, obwohl zweifellos ein Wachstum stattgefunden hatte (Bodensatz, Hefenring, Sproßverbände). Möglicherweise konnten aber doch geringe Mengen von Alkohol gebildet worden sein und um diesen qualitativ zu ermitteln, bediente man sich dreier verschiedener Methoden: der refraktometrischen Bestimmung, der Jodoformreaktion nach Sieben und der Klöckerschen Methode.

Sowohl die refraktometrische Bestimmung als auch die Jodoformreaktion versagten. Zwar trat bei dieser der charakteristische Jodoformgeruch auf, aber der gelbe Niederschlag blieb auch nach längerem Stehenlassen der

Digitized by Google · Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Flüssigkeit aus. Die Gegenwart von Alkohol war also nicht sicher. Zuverlässiger als die genannten Methoden erwies sich die von Klöcker[1]) angegebene, welche sich auf die schon von Pasteur gemachte Beobachtung bei der Destillation alkoholhaltiger Flüssigkeiten stützt. Wenn die zu prüfende Flüssigkeit Alkohol enthält, so macht sich dieser in Form charakteristischer öliger Tropfen im Kühlrohre bemerkbar. Die Erscheinung ist markanter, wenn man das erste Destillat der Versuchsflüssigkeit verwendet. Noch besser ist es, vom ersten Destillat 15—20 ccm abzudestillieren und diese für den Versuch zu nehmen. Da Klöcker die Beobachtung machte, daß sich selbst überlassene Nährflüssigkeiten, auch wenn sie steril waren, dennoch geringe Mengen Alkohol enthalten können, ist es unbedingt notwendig, jene vor der Impfung nach dem Verfahren von Klöcker auf etwa vorhandenen Alkohol zu prüfen. Es geschah dies auch im vorliegenden Falle mit dem mit Zucker versetzten Hefenwasser unmittelbar vor dem Impfen, wobei jedoch nicht die Spur Alkohol nachgewiesen werden konnte.

Nach einem Monat wurden die geimpften Versuchsflüssigkeiten, und zwar zunächst deren erstes Destillat, auf Alkohol geprüft. Auch hierbei trat keine Reaktion auf. Erst im zweiten Destillat konnten die ersten öligen Tropfen in ziemlicher Höhe des Kühlrohres ganz deutlich beobachtet werden.

Zur Sicherheit wurde noch eine zweite Versuchsreihe aufgestellt, die bereits nach 14 Tagen zum Abschluß kam, denn während eines Monates konnte auch wieder Alkohol von der Hefe assimiliert worden sein. Die Reaktion erschien in diesem Falle schon im ersten Destillat ganz deutlich.

Milchzucker wird also von Levure anamite in ganz geringen Mengen vergoren.

Bei den mit Rasse XII angestellten Versuchen waren die öligen Tropfen in sämtlichen Destillaten sehr gut zu sehen, bei Rasse II dagegen konnte in einem 14 Tage alten Versuch erst im zweiten Destillate Alkohol mit Sicherheit festgestellt werden.

3. Vergärungsgrad.

Ermittelt wurden der scheinbare und der wirkliche Vergärungsgrad in gehopfter Würze nach der Formel

$$V = \frac{E - e}{E} . 100,$$

wobei E den Extraktgehalt vor der Gärung, e denjenigen nach der Gärung anzeigt.

Zur Ausführung des Versuches befüllte man Gärflaschen mit 300 ccm einer gehopften Würze vom spezifischen Gewichte 1,0521 (bei 15° C) oder, umgerechnet, mit einem Extraktgehalt von 12,84 Proz. (oder 13,49 g in 100 ccm) und impfte mittels einer sterilen Pipette je drei Tropfen der Bodensatzhefe einer Kultur von Levure anamite ein. Die Flaschen wurden hierauf im Thermostaten bei 15° C aufgestellt und blieben dort bis zur Gewichtskonstanz (12 Tage) ruhig stehen. Nach dieser Zeit bestimmte man den Vergärungsgrad (auch den von Rasse II und XII).

Scheinbarer Vergärungsgrad:

	Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
Extraktgehalt vor der Gärung	12,84%	12,84%	12,84%
„ nach „ „	5,5%	3,7%	3,8%
Vergorener Extrakt:	7,34	9,14	9,04

---

[1]) Klöcker, A., Compt. rend. Carlsberg-Laborat. Bd. 10. 1911. 1. Lief. p. 99.

Daraus berechnet sich der scheinbare Vergärungsgrad wie folgt:

Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
57,16	71,18	70,40

Wirklicher Vergärungsgrad (Alkohol und Extrakt wurden mittels des Pyknometers bestimmt):

	Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
Extraktgehalt vor der Gärung	12,84%	12,84%	12,84%
„ nach „ „	7,73%	5,71%	5,45%
Vergorener Extrakt: (Nach Abdestillieren des Alkohols)	5,11	7,13	7,39

Der wirkliche Vergärungsgrad ist demnach:

Levure anamite	Rasse II	Rasse XII
39,79	55,53	57,55

An Alkohol wurden gefunden: bei Levure anamite 3,78, bei Rasse II 4,78 und bei Rasse XII 4,80 g in 100 ccm.

Daß Levure anamite im Vergleich zu Rasse II und XII einen so niedrigen Vergärungsgrad besitzt, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der Zucker in der Würze hauptsächlich in Form von Maltose vorhanden ist, die ja, wie die Kleingärmethode bewiesen hat, von Levure anamite ziemlich schwer angegriffen wird.

4. Gärverlauf.

a) In gehopfter Würze. Zur Darlegung des Gärverlaufes befüllte man wieder Gärflaschen mit je 300 ccm gehopfter Würze von 14° B. Die Impfmenge betrug bei einer Versuchsreihe drei Tropfen, bei einer zweiten einen Tropfen. Das Impfmaterial stammte aus der Bodensatzhefe einer 2 Tage alten Kultur von Levure anamite. Aufgestellt wurden die Kulturen bei 33° C, da diese Temperatur der optimalen nahe lag. Der Verlauf der Gärung wurde durch Wägen der Gärflaschen nach je 12 Stunden bis zur Gewichtskonstanz (Gewichtsabnahme innerhalb 12 Stunden nur mehr 0,05 bis 0,1 g) bestimmt. Beim Wägen vermied man eine stärkere Bewegung der Flüssigkeit.

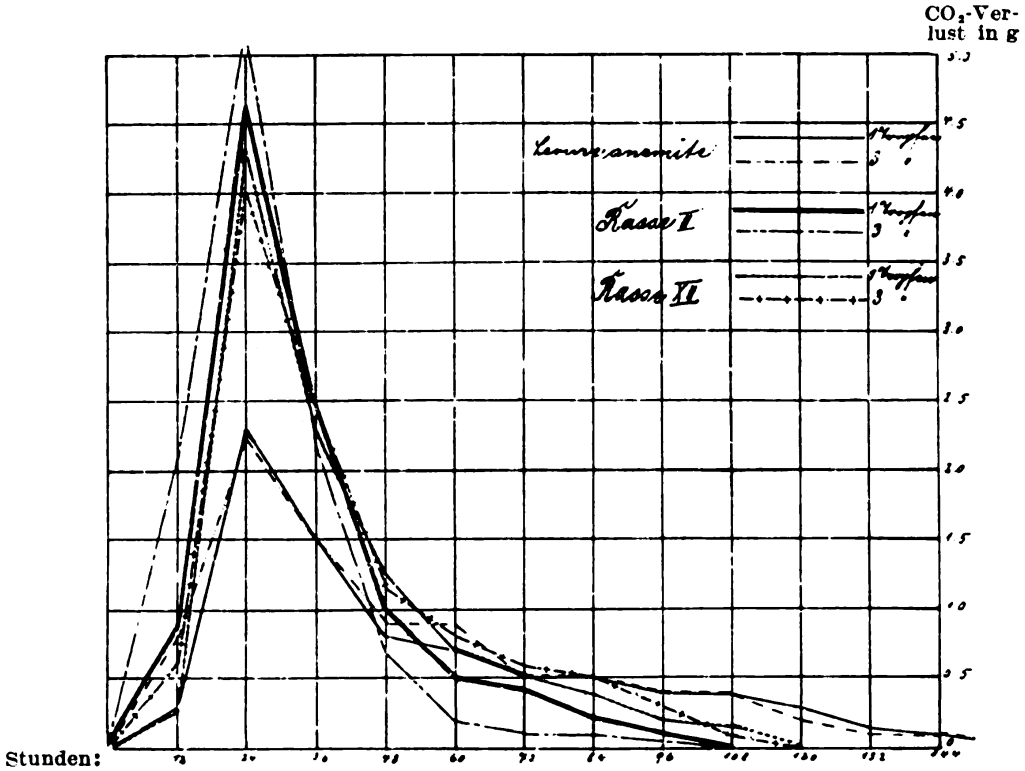
Aus der folgenden Tabelle und den Kurven ist der Gärverlauf (auch der von Rasse II und XII) ersichtlich.

CO_2-Verlust in g

	Gewogen nach Stunden	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	Gesamt-CO_2-Verlust
1 Tropfen Einsaat	Levure anamite	0,3	2,3	1,5	0,8	0,7	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,15	0,1	7,95
3 Tropfen Einsaat		0,8	2,25	1,5	0,9	0,9	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1	8,55
1 Tropfen Einsaat	Rasse II	0,85	4,6	2,45	1,0	0,5	0,4	0,2	0,1	—	—	—	—	10,1
3 Tropfen Einsaat		2,1	5,2	2,2	0,7	0,2	0,1	0,1	0,05	—	—	—	—	10,65
1 Tropfen Einsaat	Rasse XII	0,25	4,3	2,6	1,25	0,7	0,5	0,4	0,2	0,15	—	—	—	10,35
3 Tropfen Einsaat		0,6	4,0	2,5	1,15	0,8	0,6	0,5	0,3	0,1	—	—	—	10,55

Die durch die Gärung erzeugte Alkoholmenge betrug bei Levure anamite 4,0 g in 100 ccm bei einem Tropfen Einsaat und 4,14 g in 100 ccm bei drei Tropfen Einsaat. Bei Rasse II und XII war sie in beiden Fällen etwas höher als 5,0 g in 100 ccm. Der Verlauf der Gärung war bei Levure anamite ein sehr träger, was, wie schon früher erwähnt wurde, wahrscheinlich auf den hauptsächlich in Form von Maltose vorhandenen Zucker zurückzuführen ist. Bei drei Tropfen Hefeneinsaat war die Angärung naturgemäß stärker wie bei einem Tropfen, sonst aber war der Verlauf der Gärung in beiden Fällen ziemlich gleich.

b) In Maismaische. Die wenig günstigen Ergebnisse, welche bei dem Versuch über den Gärverlauf von Levure anamite in gehopfter Würze erzielt worden waren und die Überlegung, daß sich die Hefe schon seit längerer Zeit in den Amylobrennereien erprobt hat, legten den Gedanken nahe, daß der Gärverlauf bei Verwendung von Maischen, wie sie in der Brennereipraxis gebraucht werden, energischer und die Vergärung höher sei.



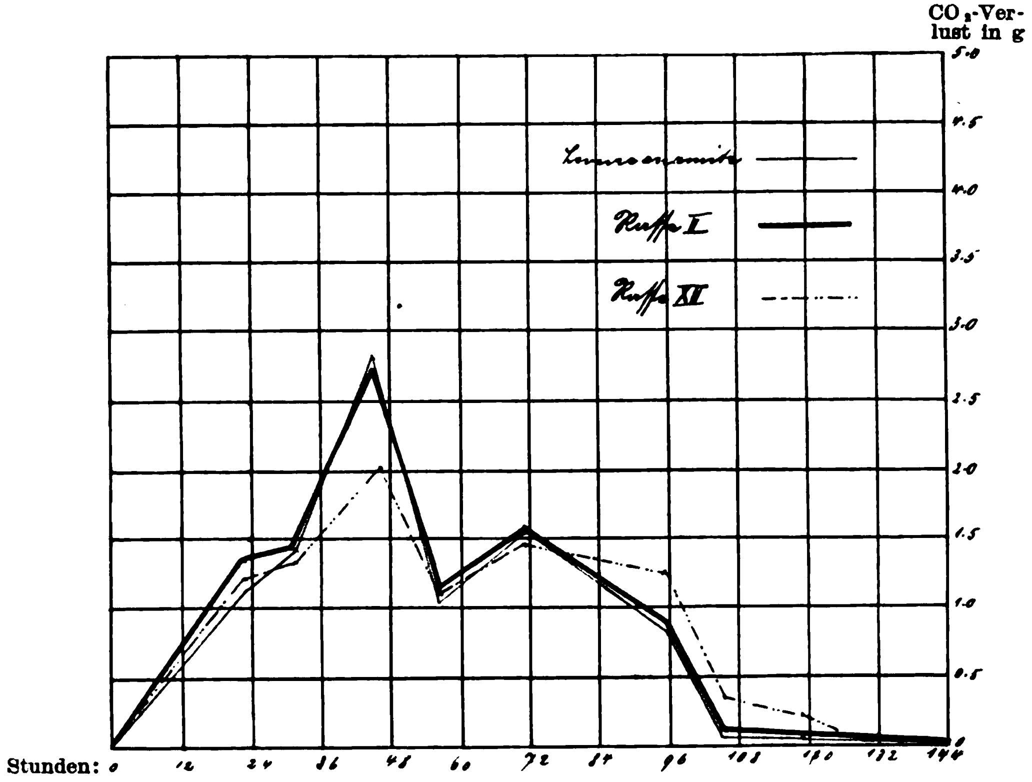
Bei den neuen Versuchen wurde eine Methode von Boidin zur Bestimmung des Stärkewertes durch Gärung benutzt, wobei die Intensität des Dämpfens etwas variiert wurde, um eventuell bessere Aufschließung und Verflüssigung des verwendeten Mais zu erzielen.

30 g Mais wurden möglichst fein gemahlen und in einem Glaskolben mit 150 ccm destillierten Wassers und 20 ccm einer 8,4proz. Weinsäurelösung versetzt. Zur Verkleisterung der Stärke taucht man den Kolben in siedendes Wasser, bis jene gut und gleichmäßig erfolgt war. Hierauf

dämpfte man unter Watteverschluß bei 1½ Atmosphären 1 Stunde lang. Nach dem Erkalten der Masse setzte man zur Neutralisation der Weinsäure 1,25 g sterilisierten kohlensauren Kalk zu und säte hierauf in sterilem Wasser aufgeschlämmte Pilzsporen (eine Platinöse) aus. Nachdem man den Glaskolben außer dem Wattepfropfen noch mit einem Gärverschluß versehen hatte, überließ man die Maische im Thermostaten bei 30° C sich selbst. Nach 24—36 Stunden war die Pilzentwicklung und die Verzuckerung soweit vorgeschritten, daß man die Einsaat der Hefe (eine Platinöse vom Bodensatz einer 2 Tage alten Würzekultur) vornehmen konnte. Im übrigen wurde, wie bei den Versuchen mit Würze verfahren, nur erfolgte die Wägung der Kulturen nicht nach gleichen Zeiträumen. Bemerkt sei auch noch, daß die Kolben nach jeder Wägung schwach bewegt wurden, um die Pilze möglichst mit allen Teilen der Maische in Berührung zu bringen. Der Verlauf der Gärung ist aus der folgenden Tabelle und aus den Kurven ersichtlich.

CO_2-Verlust in g

Gewogen nach Stunden	23	31½	46½	55½	71	95	104½	119	128	143	152	Gesamtverlust an CO_2
Levure anamite	1,12	1,43	2,79	1,01	1,53	0,82	0,12	0,11	0,03	0,07	—	9,03
Rasse II . . .	1,36	1,46	2,21	1,14	1,56	0,90	0,19	0,13	0,06	0,09	0,02	9,12
Rasse XII . . .	1,22	1,32	2,01	1,11	1,42	1,23	0,35	0,26	0,09	0,09	0,05	9,15



Die hier angegebenen Zahlen gelten erst von dem Zeitpunkte ab, wo die Hefe ausgesät wurde. Die Gewichtsabnahme während des Zeitraumes zwischen Pilz- und Hefenaussaat betrug nur 0,08—0,12 g und ist außer Acht gelassen.

Die Ausbeute vom Kilogramm Stärke (Stärkegehalt des Mais 62,3 Proz.) betrug bei Levure anamite 59,76 Literprozente.

Die Maische war bei Levure anamite bis auf 2,7° B., bei der Rasse II und XII bis auf 2,4° B. vergoren (wirkliche Vergärung). Die mit Jod versetzte Schlempe zeigte bei der ersten Hefe rotbraune, bei Rasse II violette und bei Rasse XII rotviolette Farbe, die Verzuckerung war also im allgemeinen nicht gut. Auch bei der Alkoholausbeute hätte man, aus dem Stärkegehalt des Mais zu schließen, auf 62—63 Literprozente rechnen dürfen. Jedenfalls hat aber Levure anamite in den Maismaischen erheblich bessere Ergebnisse geliefert als in Würze. Berücksichtigt muß werden, daß auch die Maismaischen noch nicht die für Levure anamite günstigsten Bedingungen darbot, wie sie der Großbetrieb bietet (Lüftung, Temperatur von 35 bis 38° C). Hierauf sind wohl in erster Linie die niederen Ausbeuten zurückzuführen.

Zur Kontrolle stellte man noch einen Versuch mit einer an der Lehr- und Versuchsbrennerei der Kgl. Akademie Weihenstephan zur Beimpfung des Amylobottichs verwendeten Levure anamite an, der bessere Ergebnisse lieferte. Die Gärung verlief bei dieser Hefe energischer als bei der ständig in Würze fortgezüchteten. Die Alkoholausbeute betrug hier 61,48 Literprozente. Möglicherweise wurde durch das fortgesetzte Weiterzüchten in Würze die Gärkraft der Hefe etwas geschwächt.

Aus diesem Versuch ist ohne weiteres ersichtlich, daß unter günstigen Vegetationsbedingungen der praktische Wert der Levure anamite keinesfalls, wie man aus den Gärversuchen in gehopfter Würze hätte schließen können, gegen denjenigen der Rasse XII und noch viel weniger gegen denjenigen der Rasse II zurücksteht.

5. Gärungsform (ober- oder untergärig).

Zur Bestimmung der Gärungsform wurden zylindrische Gefäße von 41 cm Höhe und 3,5 cm lichter Weite bis zu ungefähr $^4/_5$ ihrer Höhe mit gehopfter Würze von 11,5° B. befüllt und mit ziemlich viel Bodensatzhefe beschickt. Nach guter Vermischung von Hefe und Würze wurden die Gefäße bei Zimmertemperatur (20—22° C) aufgestellt. Die am zweiten Tage auftretenden Erscheinungen waren folgende: Gärverlauf sehr träge, schwacher Hefenauftrieb. Hefendecke mäßig stark, kein eigentlicher Hefenring. Schaumbildung mäßig stark, Würze stark getrübt, mäßiger Bodensatz.

Der Versuch wurde in der gleichen Weise wiederholt, nur kam diesmal als Aussaatmaterial die auf der Flüssigkeitsoberfläche, sowie die im Bodensatz befindliche Hefe des ersten Versuches zur Verwendung. Die Erscheinungen waren im allgemeinen die gleichen wie beim ersten Versuch, nur zeigte sich der Hefenauftrieb diesmal in verstärktem Maße. Beim Schütteln mit Wasser blieb die Hefe staubig verteilt, wie bei typischen obergärigen Hefen.

Melibiose wird von Levure anamite nicht vergoren (geprüft nach dem Verfahren von Bau). Sie erweist sich also auch in dieser Hinsicht als typische obergärige Hefe.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

III. Assimilation in mineralischer Nährlösung.

1. Kohlehydrate.

Die Versuche wurden analog denjenigen von P. **Lindner** und **Saito**[1]) ausgeführt.

Als Nährboden diente eine Lösung von 0,025 Proz. Mg SO_4, 0,5 Proz. KH_2 PO_4 und 0,5 Proz. Asparagin in Leitungswasser. Hierzu wurden 5 Proz. der zu prüfenden Zucker gegeben. Von den hexosehaltigen Nährlösungen füllte man je 5 ccm in **Freudenreich**-Kölbchen ab und sterilisierte zweimal je ½ Stunde im strömenden Dampfe. Die polyosehaltigen Nährlösungen jedoch wurden, um eine durch Erhitzen eventuell eintretende hydrolytische Spaltung zu vermeiden, folgendermaßen behandelt: Man sättigte je 100 ccm dieser Nährflüssigkeiten mit Chloroform und schüttelte möglichst oft und kräftig um. Nach einigen Tagen wurden die so behandelten, vom Chloroform abgegossenen Nährlösungen in Mengen von je 5 ccm auf **Freudenreich**-Kölbchen abgefüllt und noch eine Woche bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit erwiesen sie sich meist frei von Infektion. Die Heranzüchtung des Impfmaterials erfolgte auf 10proz. gehopfter Würzegelatine bei 16° C. Alter der Einsaat 8 Tage. Die Impfmenge war so bemessen, daß die Flüssigkeit nach Verteilung der Hefe gerade getrübt erschien. Die geimpften Kulturen blieben 10 Tage bei 25° C stehen. Die Stärke der Hefenentwicklung nach dieser Zeit wurde durch Zahlen ausgedrückt.

	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose
Levure anamite . .	2	2	3	3	3	2	3
Rasse II	2	1	2	2—3	3	1—2	3
Rasse XII	2	2	2—3	3	3	2—3	3

3 heißt: Die Entwicklung war so kräftig, daß die Flüssigkeit beim Schütteln sehr stark getrübt wurde, 2 ist gleichbedeutend mit schwacher Trübung. Die Entwicklung in den Zuckerlösungen wurde mit derjenigen in Kulturen ohne Zuckerzusatz verglichen. In diesen war gerade eine Trübung zu bemerken.

Aus der vorstehenden Tabelle sind die Ergebnisse des Versuches (einschließlich derjenigen mit Rasse II und XII) ersichtlich. Am günstigsten für die drei Hefen scheinen Raffinose und Maltose zu sein, da hier nicht nur die Trübung am stärksten war, sondern auch die Zellen die kräftigste Entwicklung zeigten.

Asparagin kann außer Stickstoff- auch noch Kohlenstoffquelle sein. Es liegt nun noch eine Versuchsreihe vor, in welcher als Stickstoffquelle $(NH_4)_2$ SO_4 verwendet wurde. Allerdings war in diesem Falle, abgesehen von dem Zusatz von $(NH_4)_2$ SO_4, die Nährlösung nicht völlig übereinstimmend mit derjenigen beim Asparaginversuch zusammengesetzt, indem sie 0,8 Proz. KH_2 PO_4, 0,3 Proz. Mg SO_4 und 0,05 Proz. KCl enthielt. Ein wesentlicher Unterschied in der Assimilierung der Zucker wird hierdurch jedoch kaum

---

[1]) **Lindner**, P., u. **Saito**, Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 27. 1910. p. 509 u. **Lindner**, P., Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 28. 1911. p. 561.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

bedingt sein. Im übrigen war die Versuchsanstellung die gleiche wie bei der ersten Reihe. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Dextrose	Lävulose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose
Levure anamite . .	1	1	1	2	3	2	3
Rasse II	1—2	1	2	2	2	1	3
Rasse XII	2	1	2	2	2	2	3

Die Zahlen dieser Tabelle, verglichen mit denjenigen der vorhergehenden, lassen erkennen, daß bei Gegenwart von Asparagin in der Nährlösung im allgemeinen doch eine etwas kräftigere Entwicklung stattfindet als wenn $(NH_4)_2 SO_4$ als Stickstoffquelle dargeboten wird.

Beide Versuchsreihen haben aber jedenfalls bewiesen, daß sämtliche verwendete Zuckerarten von Levure anamite assimiliert werden, und zwar sowohl durch die Stärke der Trübung, als auch durch den mikroskopischen Befund der Bodensätze, in denen sich Sproßverbände und typische Kronenbildung vorfand. Jedenfalls hatte also eine Vermehrung stattgefunden. Jene Zucker werden also nicht nur vergoren (Milchzucker ausgenommen), sondern auch assimiliert.

Dasselbe gilt auch von der Rasse II und XII.

2. Alkohole.

Auch dieser Versuch wurde analog demjenigen von Lindner[1]) ausgeführt.

Enghalsige Erlenmeyer-Kolben von 150 ccm Fassungsvermögen wurden mit je 50 ccm Nährlösung von folgender Zusammensetzung (nach Lindner) beschickt: 0,025 Proz. $Mg SO_4$, 0,5 Proz. $KH_2 PO_4$ und 0,5 Proz. $(NH_4)_2 SO_4$ in Leitungswasser gelöst. Nach der Sterilisation und mehrtägiger Lüftung setzte man die Alkohole sowie das Impfmaterial zu. Zur Verwendung kamen Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butylalkohol und Glyzerin. Das 6 Tage alte Impfmaterial war auf gehopfter Würzegelatine herangezüchtet worden. Jedes Kölbchen erhielt von jenem soviel, daß die Nährlösung leicht getrübt erschien.

Die Menge des zugesetzten Alkohols betrug für Methyl-, Äthylalkohol und Glyzerin je 2 Proz., für Propyl- und Butylalkohol je 6 Tropfen (ungefähr 0,25 Proz.) und für Amylalkohol je 3 Tropfen (ungefähr 0,12 bis 0,15 Proz.) zu 50 ccm Nährlösung. Eine Versuchsreihe wurde bei 24° C, eine zweite bei 8—9° C beobachtet.

Bei Abschluß der Versuche nach 4 Wochen konnte nur in den mit Glyzerin versetzten Nährlösungen ein schwaches Wachstum festgestellt werden, alle anderen Kulturen zeigten gegenüber den Kontrollversuchen ohne Alkoholzusatz keine sichtbar stärkere Entwicklung der Hefe. Levure anamite assimiliert also von den geprüften Alkoholen in mineralischer Nährlösung nur Glyzerin und auch dieses nur in geringem Maße.

---

[1]) Lindner, P., Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 29. 1912. p. 1.

Dasselbe ist von Rasse II und XII zu sagen, bei welchen schon Lindner bei seinen Versuchen mit Äthylalkohol ein Fragezeichen vermerkt.

IV. Grenztemperaturen für die Entwicklungsfähigkeit.

Sie wurden für folgende Nährlösungen zu bestimmen gesucht: gehopfte und ungehopfte Würze (11,5° B.), neutrales Hefenwasser + 10 Proz. Dextrose, neutrales Hefenwasser + 10 Proz. Saccharose, Nährlösung nach Hansen, Kartoffel-, Gelbrüben-, Weißkraut- und Weißrübenwasser. Diese Nährflüssigkeiten wurden in Mengen von je 10 ccm auf Freudenreich-Kölbchen verteilt und sterilisiert. Je ein Kölbchen der Nährlösung erhielt sodann zwei Tropfen des dickbreiigen Bodensatzes einer kräftigen, bei 25° C herangewachsenen Würzekultur. Nährflüssigkeit und Hefe wurden gut gemischt. Von dieser Mischung impfte man mit einer sterilen Pipette je 2 Tropfen in je zwei mit der gleichen Nährflüssigkeit befüllte Kölbchen ein. Nach noch nicht veröffentlichten Versuchen, welche ich durchgeführt habe, werden auf diese Weise die brauchbarsten Ergebnisse bei Bestimmung der oberen Wachstumsgrenze erzielt. Die Kulturen wurden bei verschiedenen Temperaturen 10 Tage lang beobachtet. Zeigte sich nach dieser Zeit keine sichtbare Entwicklung, so wurde die Flüssigkeit bis auf einen geringen Rest, in dem sich die eingeimpfte Hefe befand, abgegossen und durch gehopfte Würze ersetzt. Dann stellte man die Kulturen bei 25° C auf, um zu sehen, ob sämtliche Zellen abgestorben waren.

Bei 39,5° C trat in sämtlichen Nährflüssigkeiten noch lebhaftes Wachstum ein, während bei 41,6° C in den Hefenzuckerwasserlösungen, sowie in der Hansen-Lösung, in Weißrüben- und Weißkrautwasser sämtliche Zellen abgetötet waren. Es liegt also für diese Nährlösungen die obere Wachstumsgrenze zwischen 39,5° C und 41,6° C. In Würze, Gelbrüben- und Kartoffelwasser erfolgte die Abtötung sämtlicher Zellen erst bei 43° C. Die Grenze befindet sich also in diesem Falle zwischen 41,6° C und 43° C.

Die untere Grenztemperatur konnte nicht bestimmt werden. Bei 0—2° C hatte noch kräftige Entwicklung stattgefunden. Noch niedere Temperaturen standen nicht zur Verfügung.

In morphologischer Beziehung sei bemerkt, daß in fast allen Kulturen von Levure anamite, welche bei 0—2° C gestanden hatten, die Absätze hautartige Beschaffenheit angenommen hatten. Auch Rasse XII erzeugte bei den niederen Temperaturen hautartige Absätze.

Beim Schütteln der Kulturen zerfielen die Absätze in grobe Flocken. Nur in der Hansen-Lösung war der Absatz von Levure anamite von vornherein grobflockig und wurde beim Schütteln in feinere Flocken zerteilt.

In allen Kulturen von Levure anamite, wieder diejenigen in Hansen-Lösung ausgenommen, fanden sich bei Abschluß der Versuche viel abnorm geformte Zellen vor. Im allgemeinen machte sich eine Neigung zur Bildung von langgestreckten Zellen geltend. Die gleichen Erscheinungen traten bei Rasse II auf.

Die Zellen von Levure anamite waren durchschnittlich größer als unter gewöhnlichen Verhältnissen in gehopfter Bierwürze.

In Hansen-Lösung waren die Zellen von Levure anamite fast ausschließlich kugelförmig. Rasse II zeigte dagegen wieder Neigung zur Streckung der Zellen. Die kugelförmigen Zellen waren größer als unter gewöhnlichen Verhältnissen in gehopfter Würze, aber kleiner als die Zellen in den übrigen Nährlösungen der vorliegenden Versuchsreihe.

Rasse XII zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen Hefen in allen Nährlösungen meist nur normal geformte Zellen; tote fehlten fast vollständig. Diese Erscheinungen lassen darauf schließen, daß die untere Grenztemperatur für Rasse XII tiefer als für Levure anamite und Rasse II liegt.

Auch bei Rasse II und XII waren die Zellen bei der niederen Temperatur größer als bei den höheren, besonders in jenen Nährlösungen, in welchen ein ungünstiger Einfluß der niederen Temperatur noch nicht deutlich hervortrat.

In keinem Falle war in den Zellen ein merklicher Vorrat an Glykogen aufgespeichert.

Erwähnt sei noch, daß Rasse XII in bezug auf die obere Grenztemperatur mit Levure anamite übereinstimmt. Für Rasse II liegt jene um 1—2° C tiefer.

V. Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen.

Die Durchführung der Erhitzungsversuche erfolgte nach den früher von mir gemachten Angaben[1]), wobei die in der Tabelle verzeichneten Flüssigkeiten benutzt wurden. Die Erhitzungsdauer betrug ½ Stunde. Das Impfmaterial war auf 10proz. gehopfter Würzegelatine während 8 Tagen bei 20° C herangezüchtet worden.

	Gehopfte Bierwürze (11,5° B)			Ungehopf. Bierwürze (11,5° B)			Brunnenwasser			Hansenlösung			Hefenwasser + 6% Dextrose			Hefenwasser + 6% Saccharose		
Temperat. in ° C	52°	54°	56°	52°	54°	56°	52°	54°	56°	52°	54°	56°	50°	52°	54°	48°	50°	52°
Entwicklung nach Tagen bei 25° C	1	2	—	1	3	—	1	2	—	1	3	—	1	3	—	2	2	—

Bei den Versuchen mit Brunnenwasser wurde nach dem Erhitzen der größte Teil des Wassers abgegossen und durch gehopfte Bierwürze ersetzt. Die Kulturen kamen dann zu 25° C.

Mit Ausnahme der Zuckerlösungen liegt also für die benutzten Versuchsflüssigkeiten unter den eingehaltenen Bedingungen die Abtötungstemperatur zwischen 54° C und 56° C. Am wenigsten widerstandsfähig erwiesen sich die Zellen in Hefenwasser + 6 Proz. Saccharose, wo sie schon zwischen 50° C und 52° C abstarben.

Rasse XII erträgt im allgemeinen die gleichen Temperaturgrade wie Levure anamite, bei Rasse II dagegen sind die Abtötungstemperaturen um einige Grade niedriger; die Hefe ist also gegen Erhitzen empfindlicher.

VI. Entwicklungshemmung und Abtötung durch verschiedene Alkohole.

Durch den Versuch sollte ermittelt werden, welche Mengen verschiedener Alkohole zu Würze als Nährlösung zugesetzt werden müssen, um unter gleichen Verhältnissen einerseits die Entwicklung der Hefe zu hemmen und die Gärungserscheinungen aufzuheben, andererseits die Zellen abzutöten. Abgesehen vom Glyzerin dienten zum Versuch die gleichen Alkohole wie bei den Assimilierungsversuchen. Die Nährlösung war gehopfte Bierwürze von 11,5° B. Diese wurde in Mengen von genau 10 ccm in Freudenreich-Kölbchen abgefüllt. Mittels einer genau eingeteilten sterilen Pipette erfolgte dann der Zusatz der entsprechenden Alkoholmengen. Als Impfmaterial diente der Bodensatz einer 2 Tage alten Würzekultur von Levure anamite. Von diesem erhielt jedes Kölbchen mittels steriler Kapillare je drei Tropfen. Die Kulturen blieben hierauf bei ca. 24° C 10 Tage stehen.

---

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwes. Bd. 23. 1900. p. 9.

Um jene Mengen Alkohol zu finden, bei deren Zusatz sämtliche Zellen abgetötet worden waren, wurde von den Kulturen, in welchen eine sichtbare Entwicklung nicht mehr stattgefunden hatte, die alkoholhaltige Würze abgegossen und durch alkoholfreie ersetzt. Erfolgte nach 14 Tagen keine Entwicklung, so konnte angenommen werden, daß unter den gegebenen Verhältnissen durch die betreffenden Alkoholmengen sämtliche Zellen abgetötet worden waren.

Die Abtötung sämtlicher Zellen in den Kulturen erfolgte bei den nachstehenden Alkoholzusätzen:

Methylalkohol	33%	Äthylalkohol	21%
Propylalkohol	9%	Butylalkohol	5%
Amylalkohol	2,5%.		

Für die Aufhebung der Vermehrungsfähigkeit wurden folgende Grenzwerte ermittelt:

Methylalkohol	27%	Äthylalkohol	19%
Propylalkohol	7%	Butylalkohol	3%
Amylalkohol	1,5%.		

Die Grenzwerte für das Auftreten sichtbarer Gärungserscheinungen waren:

Methylalkohol	15—17%	Äthylalkohol	10%
Propylalkohol	3—5%	Butylalkohol	1—3%
Amylalkohol	ca. 0,5%.		

Dabei muß jedoch bemerkt werden, daß die Gärungserscheinungen bei kleinen Mengen von Versuchsflüssigkeiten nicht immer so deutlich sichtbar sind, daß eine scharfe Grenze festgesetzt werden könnte. Genau sind die Versuchsergebnisse bei Äthylalkohol, mit dem die Versuche wegen ihrer praktischen Bedeutung auch in größeren Mengen von Bierwürze (100 ccm) angestellt wurden.

Aus den mitgeteilten Zahlen ist deutlich zu ersehen, daß die entwicklungshemmende Wirkung der Alkohole mit der Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül steigt.

Das Verhalten von Rasse II und XII gegen die Alkohole weicht nur wenig von demjenigen von Levure anamite ab. Bemerkenswert ist vielleicht, daß Rasse XII, besonders bei Zusatz von Äthylalkohol und zwar nur solange als noch Gärung eintritt, einen Bodensatz bildete, der aus einer sehr grob gefalteten, durchscheinenden Haut bestand.

VII. Gelatineverflüssigung.

Zirka 10 ccm 10proz. Würzegelatine waren bei Stichkulturen nach einem Monat bei 20—24° C weicher geworden, nach 1½ Monaten vollständig verflüssigt.

Rasse II verflüssigte viel rascher, Rasse XII etwas langsamer als Levure anamite.

VIII. Glykogengehalt der Zellen.

Der Glykogengehalt der Zellen von Levure anamite war in den zahlreichen Präparaten, welche untersucht wurden, höchstens mäßig. Die Beobachtungen umfaßten Zellen, welche auf den verschiedensten Nährböden unter verschiedenen Verhältnissen gewachsen waren. In gehopfter Würze bei 25° C herangezüchtete Hefe zeigte nach 7 Stunden noch keine Spur von Glykogen, nach 15 Stunden war die Reaktion mit Jod meist noch sehr schwach, nach 20 Stunden teilweise schon ziemlich deutlich, bis sie nach 2 Tagen ihren Höhepunkt erreichte. Nach 7 Tagen war der Glykogenvorrat nur noch sehr gering. In älteren Hefenkulturen reagierten fast nur mehr die starkwandigen und stark granulierten Zellen (Dauerzellen), soweit sie sich im „Hefenring" angesiedelt hatten. Während die Zellen des Oberflächenbelages der Riesenkolonien, mit Ausnahme der Dauerzellen, welche stets eine stärkere Glykogenreaktion zeigten, schwache Reaktion gaben, fehlte diese in den Zellen der Anhänge entweder vollständig, oder aber sie wies nur auf Spuren von Glykogen hin.

Bei Rasse II und XII war der Glykogengehalt merklich größer als bei Levure anamite.

Zusammenfassung.

Die in den Amylobrennereien verwendete, als Levure anamite bezeichnete Hefe ist ein obergäriger Saccharomycet und zwar aus der Gruppe der wilden Hefen. Zellen der Gärungsform meist oval, doch auch kugelförmig (kleinere Zellen). Zellgröße 4,0 : 4,0 bis 9,6—11,2 μ. Riesenzellen nicht selten. Dauerzellen. Lichtbrechungsvermögen und Beschaffenheit des Inhaltes der vegetativen Zellen wie bei wilden Hefen. Sproßverbände mit wenigen Gliedern. Kronenbildung, häufig in Zuckerlösungen, sowie in Kartoffel- und Weißrübenwasser. In Hautbildungen neben ovalen und rundlichen Zellen auch langgestreckte, wurstförmige bis zu 12,8 : 4,0 μ. Auch hier Sproßverbände meist nur mit wenigen Gliedern. Weitverzweigte Sproßverbände langgestreckter, wurstförmiger Zellen in den Anhängen der Riesenkolonien. Wachstumserscheinungen in Tröpfchenkulturen im allgemeinen mit denjenigen von wilder Hefe übereinstimmend. Aussehen der Sporen wie bei wilder Hefe. Sporen kugelförmig, 1—4; Größe 2,4—4,0 μ. Optimum der Sporenbildung 33° C (9 Stunden), Maximum 35° C (12 Stunden), Minimum 12° C (50 Stunden). Sporenbildungsvermögen im allgemeinen nicht stark ausgeprägt. Auskeimen der Sporen nach Typus I. Hautbildung nach Typus II a, mit einer „ersten Generation echter Hautzellen". Optimum der Hautbildung auf Würze 31° C. Einzellkolonien in Würzegelatine nach Typus I und II. Riesenkolonien nach Typus I a. Generationsdauer bei 26° C 2 Stunden. Vergärt und assimiliert Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose und Raffinose. Milchzucker wird assimiliert, aber nur sehr schwach vergoren. Gärverlauf in Würze sehr langsam, in Maismaische energischer; in dieser Vergärungsgrad hoch. Obere Wachstumsgrenze in Hefenzuckerwasser, Hansen-Lösung, Weißrüben- und Weißkrautwasser zwischen 39,5° C und 41,6° C, in Würze, Gelbrüben- und Kartoffelwasser zwischen 41,6° C und 43° C. Abtötungstemperatur in verschiedenen Flüssigkeiten meist zwischen 54° C und 56° C. Grenzwerte für die Entwicklungsfähigkeit in Nährlösungen mit Alkoholzusatz zwischen 1,8 Proz. bei Amylalkohol und 15—27 Proz. bei Methylalkohol. Grenzwerte für die Abtötung der Zellen durch Alkohole entsprechend zwischen 2,5 und 33 Proz. Verflüssigungsvermögen von Gelatine gering.

Nach einem Vergleich mit den bis jetzt genauer beschriebenen Hefen ergibt sich, daß die mit Levure anamite bezeichnete Hefe eine neue Art darstellt. Sie soll Saccharomyces anamensis Will et Heinrich genannt werden.

Die Zeichnungen und photographischen Aufnahmen hat Herr Heinrich gefertigt.

München, Juni 1913.

Nachdruck verboten.

Untersuchung der Moskauer Marktmilch.

[Aus dem Laboratorium der bakteriologisch-agronomischen Station bei der Kaiserl. russischen Akklimatisationsgesellschaft für Pflanzen und Tiere in Moskau.]

Von **A. Wojtkiewicz.**

Meine Milchprüfung wurde den vier Jahreszeiten angepaßt. Es wurden festgestellt: 1. Der Gesamt-Keimgehalt mit Verteilung auf die wichtigsten Bakteriengruppen, 2. wurde gemacht die Leukocytenprobe, 3. die Katalaseprobe, 4. die Reduktionsprobe, 5. die Gärprobe. Dazu kam noch die Bestimmung des Säuregrades, des spez. Gewichts und des Fettgehaltes.

1. Zur Ermittlung des Gesamt-Keimgehaltes wurde bloß ein Medium, Fleisch-Pepton-Gelatine, benutzt, damit die Arbeit nicht zu kompliziert ausfiel. Dabei wurde die Menge der die Gelatine verflüssigenden Keime gezählt. Die Schälchen wurden 6—7 Tage bei 20° C gehalten. Zur Zählung der Milchsäurebakterien benutzte ich Molken-Kreide-Gelatine. Die Gruppe der Coli aërogenes-Bakterien wurde unter Benutzung der Verdünnungsmethode in Äskulinbouillon gezählt.

2. Die Leukozytenprobe wurde in zugespitzten Röhrchen der Firma Hugershof ausgeführt, wobei mit Rücksicht auf die Angaben, daß es dabei bei weitem nicht sämtliche Leukozyten in das Sediment zu schleudern gelingt, die Dauer der Zentrifugierung bis zu 5 Minuten ausgedehnt wurde. Bei jeder Probe wurde das Sediment mikroskopisch untersucht.

3. Die Katalaseprobe wurde in dem Apparate von Burri und Staub ausgeführt (10 ccm Milch + 3 ccm 1-proz. Wasserstoffsuperoxyd). Der Versuch war von 2-stündiger Dauer bei 20—25° C. Die von mir ermittelten Zahlen müssen zum Vergleich mit den gewöhnlichen 1½-mal größer genommen werden, denn gewöhnlich wird der Versuch mit 15 ccm Milch + 5 ccm H_2O_2 gemacht. Auf das Schütteln der Milch-Wasserstoffsuperoxyd-Mischung wurde verzichtet. Die Stärke der H_2O_2-Lösung wurde durch Titration mit n/10 $KMnO_4$ kontrolliert.

4. Die Reduktionsprobe wurde mit 20 ccm Milch + 0,5 ccm Methylenblaulösung von entsprechender Konzentration durchgeführt bei 38—40° (M-Reaktion). Parallel wurden Bestimmungen auch mit Formalin-Methylenblaulösung (F-M-Reaktion) durchgeführt (10 ccm Milch + 0,5 ccm F-M-

Lösung) bei 45° C. Bei 38° C (wie bei Burri) war die Reaktion bedeutend langsamer.

5. Bei der Gärprobe wurde die Milch durch 18 Stunden bei 38—40° C gehalten und hierauf der Charakter des Gerinnsels bestimmt.

6. Der Säuregrad wurde in Thörner-Graden (n/10 Lauge) bestimmt.

7. Das spez. Gewicht wurde im Pyknometer bestimmt.

8. Der Fettgehalt wurde nach Gerber bestimmt.

Die von mir geprüfte Milch teile ich in folgende Gruppen:

I. Milch aus großen Molkereien.
II. Milch von Kleinhändlern und kleinen Milchhallen.
III. Marktmilch im wahren Sinne des Wortes, d. h. bezogen von Markthändlerinnen an Markttagen.
IV. Milch, welche Konsumenten aus den Dörfern der Umgegend zugestellt wird.
V. Milch von höherer Qualität, aus einer Meierei bezogen, etwas ähnlich der deutschen Vorzugsmilch.
VI. Pasteurisierte Milch.

Die von uns gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Zur Erörterung dieser Versuche übergehend, darf ich es fürs erste nicht verschweigen, daß in Anbetracht der beschränkten Anzahl der vorgenommenen Analysen meine Durchschnittswerte natürlich eine sehr relative Bedeutung haben.

Was zunächst den Gesamtkeimgehalt anbelangt, so verzeichne ich behufs besserer Übersichtlichkeit bei der Charakteristik der verschiedenen Milchgruppen meine ermittelten Durchschnittswerte nach den Jahreszeiten (s. Tabelle 2).

Vergleicht man die ermittelten Durchschnittswerte des Gesamtkeimgehaltes nach den Jahreszeiten, so sieht man, daß dieselben für den Winter und Frühling fast identisch sind, im Herbst bloß ein wenig ansteigen, während im Sommer die Werte um das Vierfache höher sind. In dieser Hinsicht läßt sich ein scharfer Unterschied zwischen den Moskauer und Leipziger (Schröter[1]) Werten konstatieren. In der Leipziger Milch sind die Durchschnittszahlen im Juli-August einerseits und im Oktober andererseits beinahe die gleichen, was Schröter durch die Rübenblattfütterung im Oktober erklärt. In Moskau unterscheidet sich wahrscheinlich wegen Abwesenheit derartigen Futters, sowie auch infolge früh eintretender Kälte die Herbstmilch scharf von der Sommermilch.

Wenn ich die für die Moskauer Milch erzielten Werte mit den Zahlen von O. Jensen, Schröter, Profé, Braidner u. a. für Kopenhagen, Leipzig, Köln, die Vereinigten Staaten usw. vergleiche, so komme ich zu dem Schluß, daß die russische Milch von bedeutend niedrigerer Qualität ist.

Zur Charakteristik der Moskauer Milch nach Bakteriengruppen sind in Tabelle 3 die Durchschnittswerte zusammengestellt.

Vergleicht man den Gesamtkeimgehalt nach Bakteriengruppen, so sieht man, daß im Sommer der auf die Milchsäurebakterien entfallende Anteil die höchste Ziffer — 54,5 Proz. erreicht, im Herbst dagegen die niedrigste — 33,8 Proz. Der Prozentsatz der die Gelatine verflüssigenden Bakterien ist meistens umgekehrt proportional dem Gehalte an Milchsäurebakterien. Für die Coli aërogenes-Gruppe ist der Anteil der höchste im Sommer.

---

[1] Schröter, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 181.

Von Interesse ist die Tatsache, daß die pasteurisierte Milch einen bedeutenden Prozentsatz von Milchsäurebakterien enthält, was nicht zufällig erscheint, weil das nämliche vor einigen Jahren von Severin und Budinoff verzeichnet worden ist.

Vergleicht man den Gruppengehalt der Bakterienflora der Moskauer Milch mit dem, sagen wir, der Leipziger Milch nach der Schröterschen Arbeit, so springt vor allem ein geringerer Prozentsatz von Milchsäurebakterien in ersterer in die Augen. Der von mir nach der Schröterschen Arbeit berechnete Durchschnittswert für die Leipziger Marktmilch beträgt — 69 Proz., während die Moskauer Marktmilch — 29 Proz. aufweist.

Der Gehalt an Coli aërogenes ist in der Moskauer Milch geringer als in der Leipziger.

Die Leukozytenprobe lieferte, wenn man nach dem Quantum des Sedimentes urteilt, ungenügende Resultate. Dubiöse Milch mit einem Keimgehalt von mehrfach zehn Millionen oder mit hoher Katalasezahl ergab gewöhnlich 0,2—0,3 Promille Sediment. Die Milch No. 31 mit höchster Katalasezahl und für Mastitis typischem mikroskopischen Bilde lieferte 0,4 Promille Sediment. Demgegenüber lieferte No. 29 mit niedriger Katalasezahl 0,7 promill. Sediment. Indessen wurden durch mikroskopische Durchmusterung des Sedimentes meistenteils wertvolle Resultate ermittelt, wobei eine Übereinstimmung der Ergebnisse der Katalaseprobe mit denen des mikroskopischen Bildes zum Vorschein kam.

Was die Katalaseprobe anbelangt, so konnte man in denjenigen Fällen, wo die Milch bei 10 ccm Milch + 3 H_2O_2 mehr als 1,7—2,0 ccm Sauerstoff, was 2,5—3,0 ccm bei 15 ccm Milch entspricht, lieferte, in derselben meistens eine anormale Leukozyten- oder Streptokokkenmenge konstatieren. Doch eine Übereinstimmung zwischen Keimzahl und Katalaseprobe wurde gewöhnlich nicht beobachtet.

Dagegen zeigte die Reduktionsprobe, und zwar die Methylenblauprobe, in allgemeinen Zügen eine Übereinstimmung mit der Keimzahl der Milch, obgleich einzelne Abweichungen beobachtet wurden. Was die Formalin-Methylenblauprobe anbelangt, so lieferte diese weniger übereinstimmende Resultate.

Stellen wir die Durchschnittswerte der besprochenen Proben der Keimzahl, nach den Jahreszeiten verteilt, gegenüber, so erhalten wir

	Winter	Frühjahr	Sommer	Herbst
Keimzahl pro 1 ccm	4 340 000	4 250 000	17 900 000	5 190 000
Katalaseprobe (ccm N_2) . .	1,25	1,58	2,0	1,08
M-Probe } Reduktionszeit	5 Std. 3 Min.	4 Std. 39 Min.	3 Std. 34 Min.	5 Std. 8 Min.
F-M- „ } Reduktionszeit	10 Std. 4 Min.	8 Std. 3 Min.	6 Std. 2 Min.	6 Std. 8 Min.

Die Gärprobe lieferte meistenteils unsichere Resultate. Das Gerinnsel hatte vorwiegend den Typus K_3-bl.

Die Bestimmung des Säuregrades, des spez. Gewichtes und des Fettgehaltes, nicht minder auch die Berechnung der Trockensubstanz nach der Fleischmannschen Formel ist vor allem zur Ermittlung von Milchfälschung, hauptsächlich von Wasserverdünnung oder Zusatz von entrahmter Milch von Interesse. Den höchsten Prozentsatz von Fälschung lieferte die Gruppe II, d. h. die Milch von kleinen Milchhallen. Zwei Drittel (65 Proz.)

Tabelle 1.

No.	Name der Milch	Datum der Probeentnahme	Lufttemperatur	Zahl der Keime in 1 ccm	Milchsäurebakterien	Gelatineverflüssigung	Coli-Gruppe	Trommsdorffsche		
								Sediment		Mikro-
					%	%	%	‰	Schmutz	Leukozyten
					Wintermilch.					
1	Große Molkereien	25. I.	—10°	1 590 000	12,5	3,1	0,1—1,0	0,1	I	II
2		„	„	550 000	50,0	0,4	0,04—0,4	0,1	I	II
3		30. I.	—2°	1 375 000	66,6	0,3	0,01—0,1	0,1	I	I
4		6. II.	—4°	131 000	37,0	6,1	0,8—7,6	0,1	I	III
5	Kleine Milchhallen	25. I.	—10°	13 825 000	57,8	1,1	0,02—0,2	0,15	III	II
6		„	„	3 450 000	33,0	5,2	0,08—0,8	0,1	IV	IV
7	Marktmilch	10. II.	—16°	150 000	53,3	1,3	0,07—0,7	0,2	III	III
8		„	„	950 000	42,0	7,4	0,1—1,1	0,25	IV	IV
9		15. II.	—8°	30 000	10,0	3,3	0,7—6,7	0,25	V	IV
10		„	„	21 000 000	64,2	1,0	0,005—0,05	0,2	IV	III
11		17. II.	+2°	33 000	33,0	3,0	3,0—30,0	0,2	III	I
12		„	„	17 400 000	85,3	1,7	0,06—0,6	0,2	III	V
13	Dorfmilch	30. I.	—2°	12 970 000	50,6	2,2	0,08—0,8	0,15	III	II
14		„	„	105 000	75,0	2,0	0,9—9,0	0,2	I	V
15		7. II.	—25°	196 000	32,5	7,1	5,0—50,0	0,2	V	III
16	Bessere Milch	6. II.	—4°	110 000	56,0	0,9	0,09—0,9	0,2	I	IV
17		21. II.	+2°	82 500	29,2	2,1	1,2—12,0	0,2	I	I
18	Pasteurisierte Milch	30. I.	—2°	4 175 000	Sehr viel	0,2	0,25—2,5	0,1	I	IV
19		8. II.	—30°	346 000	40,0	0,3	0,3—2,9	0,1	I	III
20	Magermilch	8. II.	—30°	1 925 000	71,0	1,3	0,01—0,1	1,3	I	II
					Frühlingsmilch.					
21	Große Molkereien	9. IV.	5°	21 500 000	6,7	0,6	0,005—0,05	0,3	IV	III
22		10. IV.	2°	112 000	20,0	0,0	0,9—9,0	0,3	III	IV
23		18. IV.	2°	1 420 000	33,9	?	0,01—0,1	0,2	II	IV
24	Kleine Milchhallen	16. IV.	6°	3 085 000	63,1	?	0,03—0,3	0,25	V	IV
25		17. IV.	7°	22 500 000	86,7	?	0,05—0,5	0,2	I	III
26		19. IV.	4°	725 000	80,0	2,8	1,4—14,0	0,3	IV	III
27		8. V.	12°	1 480 000	57,1	1,7	0,08—0,8	0,3	IV	IV
28	Marktmilch	20. IV.	4°	1 500 000	41,3	12,3	0,9—9,0	0,2	III	III
29		„	„	330 000	27,2	6,2	0,3—3,0	0,7	IV	II
30		9. V.	14°	600 000	2,0	28,6	0,5—5,0	0,2	IV	III
31		„	„	15 900 000	26,0	0,1	0,07—0,7	0,4	III	IV
32		11. V.	18°	100 000	<10,0	20,0	1,5—15,0	0,2	II	III
33		„	„	900 000	37,0	15,6	0,1—1,1	0,2	IV	IV
34	Dorfmilch	12. IV.	6°	208 000	33,3	4,9	0,5—5,0	0,2	II	V
35		14. IV.	5°	1 500 000	95,0	0,3	0,6—5,7	0,5	IV	II
36	Bessere Milch	13. IV.	2°	262 000	49,6	5,0	0,04—0,4	0,3	I	III
37		16. V.	18°	49 000	26,5	6,1	0,02—0,2	0,35	I	III
38	Pasteurisierte Milch	11. IV.	5°	355 000	51,2	0,0	0,3—2,8	0,25	I	V
39	Magermilch			80 000 000	53,0	0,2	0,01—0,13	1,0	I	III
40	Frisch gemolkene Milch	14. V.	19°	22 000	?	?	<0,05	0,3	I	II

Tabelle 1.

Probe			Katalase-probe 10 ccm der Milch + 3 ccm 1% H_2O_2	Reduktionsprobe		Gärprobe	Säuregrad nach Thörner	Spez. Gewicht	Fettgehalt	Trockensubstanz
skopisches Bild										
Bakterien	Schmutz			M. 38—40°	F.—M. 45°					
Wintermilch										
II	II		1,65	4 St. 45′	4,5′	k_3—bl_1	21,5	1,0327		
II	II		1,25	5 „ 30′	10′	k_3—bl_1	21,0	1,0325		
II	II		0,4	5 „ 15′	15′	k^3	21,5	1,0330		
II	II		1,5	7 „ 15′	13′	fl_2	19,0	1,0325		
IV	IV		1,9	2 „ —	3,5′	k_3—bl_1	21,5	1,0313		
III	V		1,5	3 „ 45′	2,5′	k_3—bl_1	19,0	1,0326		
II	IV		0,65	>6 „ —	13′	k_3—bl_1	23,5	1,0359		
IV	III		1,4	3 „ 50′	5′	k_3—bl_1	21,5	1,0363		
II	IV	Strept.	1,3	>6 „ —	11′	fl_2	22,0	1,0348		
VI	IV	Strept.	1,5	4 „ —	13′	z_2—bl_1	20,0	1,0354		
II	I	Hefen	1,1	5 „ 45′	14′	k_3—bl_2	22,0	1,0344		
VI	V		3,5	2 „ 10′	1,5′	k_3—bl_1	21,5	1,0322		
V	IV		1,25	1 „ 45′	13′	k_3—bl_1	24,5	1,0338		
I	II		0,85	5 „ —	15′	k_3—bl_1	22,5	1,0340		
I	V		0,35	5 „ 15′	10′	k_3—bl_1	20,5	1,0336		
I	I		1,8	11 „ —	12′	fl_3	19,0	1,0322		
I	I		0,5	8 „ —	8′	k_3—bl_1	20,5	1,0314		
III	II	Strept.	0,9	2 „ 30′	18′	k_3—bl_1	18,5	1,0330		
II	I		0,35	6 „ —	15′	k_3	19,5	1,0330		
IV	II	Viele Strept.	1,4		14′	k_3		1,0352		
Frühlingsmilch										
IV	IV		2,4	2 „ 10′	4′	k_3	18,5	1,0323	3,9	13,02
II	III		0,9	6 „ —	10′	k_3—bl_1	19,5	1,0334	3,4	12,69
II	I		1,1	6 „ —	11′	k_2—bl_1	18,5	1,0324	3,3	12,32
IV	IV		0,95	6 „ —	12′	k_3—bl_1	14,5	1,0288	2,6	10,58
III	II		1,75	1 „ 30′	2′	k_3—bl_1	19,5	1,0325	3,2	12,23
III	III		0,5	5 „ —	16′	k_3—bl_2	20,5	1,0346	2,2	11,55
III	III		1,6	3 „ 50′	7′	gl_3—bl_1	?	1,0336	2,8	12,02
III	IV		0,4	5 „ 30′	15′	k_3—bl_1	18,5	1,0240	2,7	9,48
II	II		0,6	4 „ 10′	7′	gl_2	22,0	1,0330	3,9	13,19
III	II		1,1	5 „ —	11′	fl_2—bl_2	17,0	1,0283	3,1	11,05
VI	III	**S.v.Str.**	6,0	— „ 10′	0,5′	k_3—bl_1	21,0	1,0325	3,6	12,71
III	I		3,8	5 „ —	5′	gl_3—bl_1	21,5	1,0330	4,3	13,67
II	II		2,6	2 „ 15′	7′	k_3—bl_1	18,0	1,0312	4,0	12,86
II	II		1,0	7 „ —	9′	k_2—bl_1	20,0	1,0326	3,8	12,97
III	II		0,85	2 „ 30′	3,5′	gl_2—bl_1	19,5	1,0341	3,4	12,87
I	I		0,55	>8 „ —	8′	k_3	17,5	1,0307	4,8	13,70
II	II		0,9	7 „ 30′	11,5′	gl_3	19,5	1,0326	3,6	12,73
II	I	Strept.	1,4	6 „ —	10′	gl_3—bl_1	18,0	1,0320	3,8	12,82
IV	III	Strept.	4,5	— „ 7′	2′	k_3—bl_1	29,5	1,0366	—	9,53
0	I		0,2	>7 „ —	12,5′	k_2	20,0	1,0314	4,2	13,15

Tabelle 1

No.	Name der Milch	Datum der Probeentnahme	Lufttemperatur	Zahl der Keime in 1 ccm	Milchsäurebakterien %	Gelatineverflüssigung %	Coli-Gruppe %	Trommsdorffsche		
								Sediment		Mikro-
								‰	Schmutz	Leukozyten
				Sommermilch.						
41	Große Molkereien	20. VI.	19°	2 300 000	26,5	2,6	0,4—4,3	0,5	I	IV
42		24. VII.	30°	5 200 000	61,5	11,6	0,2—2,0	0,4	I	IV
43		28. VII.	29°	6 125 000	80,0	>6,0	2,0—20,0	0,2	II	III
44		31. VII.	17°	33 000 000	65,0	4,9	3,0—30,0	0,2	II	IV
45	Kleine Milchhallen	19. VII.	29°	>32000000	4,0?	Sehr viel	0,4—4,0	0,35	I	V
46		23. VII.	30°	43 000 000	82,0	0,4	> 0,2	0,2	III	IV
47	Marktmilch	27. VII.	31°	82 500 000	73,2	0,9	> 1,2	0,2	IV	II
48		„	„	12 400 000	3,3	29,2	0,8—8,0	0,3	VI	III
49		„	„	380 000	50,0	5,2	2,6—26,0	0,1	IV	III
50		„	„	500 000	20,0	?	2,0—20,0	0,2	III	IV
51		29. VII.	20°	700 000	Sehr viel	?	1,4—14,0	0,4	VI	III
52		„	„	140 000	?	?	< 7,0	0,25	III	?
53	Dorfmilch	18. VII.	25°	173 000	63,6	1,2	5,7—57,0	0,35	II	IV
54	Bessere Milch	26. VII.	31°	>50000000	96,0	?	> 0,2	0,2	I	II
55		28. VII.	29°	13 000	46,1	7,7	0,8—7,7	0,25	I	IV
56	Pasteurisierte Milch	19. VI.	18°	440 000	53,6	2,3	0,16—1,6	0,45	I	IV
57	Magermilch	24. VII.	30°	59 000 000	67,8	?	> 0,2	2,4	I	IV
				Herbstmilch.						
58	Große Molkereien	16. X.	—6°	78 000	35,5	1,7	1,3—13,0	0,2	III	III
59		17. X.	+2°	225 000	81,8	5,7	0,5—4,5	0,15	III	HI
60		18. X.	+4°	2 750 000	11,2	2,4	0,03—0,3	0,3	II	II
61		25. X.	—3°	22 000 000	28,2	1,2	0,001—0,005	0,2	III	V
62	Kleine Milchhallen	8. X.	+2°	2 530 000	37,9	10,0	0,4—4,0	0,15	IV	II
63		15. X.	—11°	24 200 000	58,7	4,9	0,005—0,05	0,2	III	III
64		16. X.	—6°	235 000	61,5	15,4	3,8—38,0	0,15	III	II
65	Marktmilch	19. X.	+4°	27 500 000	1,6	0,7	< 0,004	0,2	IV	?
66		„	„	1 975 000	< 1,0	0,7	0,07—0,7	0,3	V	IV
67		24. X.	—2°	12 925 000	11,6	2,6	0,001—0,01	0,3	III	IV
68		„	„	395 000	29,4	1,2	0,001—0,005	0,2	III	V
69		26. X.	—6°	905 000	15,6	9,4	0,2—1,6	0,2	IV	VI
70		„	„	365 000	27,8	22,2	0,3—2,8	0,2	II	VI
71	Dorfmilch	16. X.	—6°	152 000	32,9	30,9	6,6—66,0	0,15	III	II
72		17. X.	+2°	820 000	25,6	2,4	1,2—12,0	0,15	III	IV
73		23. X.	—1°	2 800 000	30,6	4,6	0,04—0,4	0,2	IV	III
74	Bessere Milch	18. X.	+4°	815 000	18,4	0,5	0,01—0,1	0,3	II	II
75		22. X.	—2°	2 515 000	2,1	37,4	0,005—0,05	0,2	II	III
76		„	„	42 600	16,0	14,0	0,2—2,4	0,25	I	III
77		26. X.	—6°	725 000	12,4	34,4	0,001—0,01	0,2	III	IV
78	Pasteurisierte Milch	15. X.	—11°	23 200	54,5	7,1	0,5—5,0	0,15	III	IV
79	Frisch gemolk. Milch	13. X.	—7°	13 500	< 50,0		< 7,0	0,2	II	I

(Fortsetzung).

Probe			Katalase-probe 10 ccm der Milch + 3 ccm 1% H_2O_2	Reduktionsprobe		Gärprobe	Säuregrad nach Thörner	Spez. Gewicht	Fettgehalt	Trockensubstanz
skopisches Bild				M. 38—40°	F.—M. 45°					
Bakterien	Schmutz									
				Sommermilch						
V	II		2,8	3 St. —	4′	k$_3$—bl$_1$	20,5	1,0317	3,8	12,75
III	I		2,0	3 „ —	6′	gl$_3$	20,0	1,0305	4,0	12,69
IV	III		2,2	3 „ —	4′	gl$_3$—bl$_1$	22,0	1,0310	3,7	12,45
III	II		2,7	2 „ 30′	9′	gl$_3$—bl$_1$	21,0	1,0306	4,0	12,71
V	II		4,3	2 „ —	4′	gl$_3$—bl$_1$	20,5	1,0312	3,2	11,90
VI	III		3,2	— „ 40′	5′	gl$_3$	18,0	1,0278	2,9	10,69
V	II		2,9	— „ 20′	2,5′	gl$_3$	22,0	1,0324	3,4	12,44
VI	VI	**Schimmelpilz.**	1,8	1 „ 45′	1,5′	k$_3$	23,0	1,0324	5,2	14,60
III	III		?	5 „ 30′	12′	k$_3$	20,0	1,0316	3,6	12,48
VI	V		1,5	5 „ —	3,5′	k$_3$	21,0	1,0313	3,3	12,05
III	VI		1,8	2 „ 15′	6′	gl$_2$—bl$_1$	23,0	1,0333	4,2	13,63
II	III		0,7	6 „ —	5′	k$_3$—bl$_1$	20,0	1,0306	4,6	13,43
III	III		1,25	>8 „ —	8′	gl$_3$	18,0	1,0308	5,1	14,08
V	I		1,2	— „ 30′	4′	gl$_3$—bl$_1$	22,0	1,0328	3,8	13,02
II	II		0,75	6 „ —	9′	k$_3$—bl$_1$	20,0	1,0325	3,5	12,59
I	I		0,9	8 „ 30′	15′	k$_3$—bl$_1$	19,0	1,0320	3,5	12,46
VI	II		3,5	— „ 30′	7′	gl$_3$	18,0	1,0302	—	7,9
				Herbstmilch						
II	II		1,15	7 „ —	8′	fl$_2$—bl$_1$	20,0	1,0325	3,7	12,83
IV	III		1,25	6 „ —	9′	k$_3$—bl$_1$	20,0		4,3	
III	II		0,8	3 „ —	7′	k$_3$—bl$_1$	20,0	1,0317	4,4	13,47
IV	II		2,0	3 „ 20′	9′	gl$_2$	20,0	1,0313	3,4	12,17
II	III		0,8	7 „ —	8′	k$_1$—bl$_1$	16,0	1,0266	2,3	9,66
II	II		1,2	1 „ —	3′	k$_3$—bl$_1$	19,0	1,0273	2,9	10,56
IV	II		1,5	6 „ 30′	8′		19,5	1,0339	3,2	12,58
IV	V		1,0	4 „ 15′	6′	fl$_1$	22,5	1,0341	4,9	14,67
IV	V		0,9	2 „ 15′	7′	k$_3$—bl$_1$	19,0	1,0318	3,9	12,89
V	IV	Strept.	3,8	2 „ —	3′	gl$_2$	20,0	1,0304	4,7	13,50
IV	II		1,2	4 „ 20′	7′	k$_3$	51,5	1,0320	3,7	12,70
III	III		0,8	>5 „ —	6′	k$_3$	19,5	1,0286	4,7	13,05
II	II		0,5	3 „ 40′	7′	k$_3$	22,5	1,0364	3,4	13,44
III	II		0,4	7 „ —	5,5′		16,5	1,0260	3,9	11,43
III	III		0,5	>6 „ —	4,5′	k$_3$—bl$_1$	19,5	1,0311	4,9	13,92
V	II	**Wenige Strept.**	1,5	5 „ —	6′	gl$_3$	26,0	1,0359	4,0	14,04
III	II		1,0	7 „ —	8,5′	k$_3$	21,0	1,0328	4,5	13,86
IV	II		0,8	7 „ —	10′	fl$_2$—bl$_1$	20,5	1,0332	3,9	13,24
I	I		0,7	>7 „ —	3′	k$_2$—bl$_1$	22,0	1,0333	3,5	12,79
III	III		0,6	>5 „ 30′	5,5′		20,0		3,9	
III	II		0,2	8 „ —	11′	k$_3$—bl$_1$	19,0	1,0330	3,9	13,19
I	II		0,2	>7 „ —	4′	k$_3$—bl$_1$	20,0	1,0356	4,0	13,96

Tabelle 2.

	Winter	Frühling	Sommer	Herbst	Im Mittel
Große Molkereien .	911 500	7 677 300	11 656 200	6 263 000	6 557 000
Kleine Milchhallen .	8 637 500	6 947 500	37 500 000	8 988 300	13 366 000
Marktmilch	6 594 000	3 221 700	16 103 300	7 344 200	8 316 000
Dorfmilch	4 423 000	854 000	173 000	1 257 300	2 103 000
Bessere Milch . . .	96 200	155 500	25 006 000	1 024 200	5 461 000
Im Mittel	4 341 000	4 250 000	17 900 000	5 190 000	7 920 000
Große Molkereien .	131 000— 1 590 000	112 000—21 500 000	2 300 000— 33 000 000	78 000—22 000 000	78 000— 33 000 000
Kleine Milchhallen .	3 450 000—13 825 000	725 000—22 500 000	732 000 000— 43 000 000	235 000—24 200 000	235 000— 43 000 000
Marktmilch	30 000—21 000 000	100 000—15 900 000	140 000— 82 000 000	365 000—27 500 000	30 000— 82 000 000
Dorfmilch	105 000—12 970 000	208 000— 1 500 000	173 000	152 000— 2 800 000	105 000— 12 970 000
Bessere Milch . . .	82 000— 110 000	49 000— 262 000	13 000—750 000 000	42 000— 2 515 000	13 000—750 000 000

Tabelle 3.

	Winter			Frühling			Sommer			Herbst			Im Mittel		
	Milchsäure-bakterien %	Gelatine-verflüssigung %	Coligruppe %	Milchsäure-bakterien %	Gelatine-verflüssigung %	Coligruppe %	Milchsäure-bakterien %	Gelatine-verflüssigung %	Coligruppe %	Milchsäure-bakterien %	Gelatine-verflüssigung %	Coligruppe %	Milchsäure-bakterien %	Gelatine-verflüssigung %	Coligruppe %
Große Molkereien .	41,5	2,5	0,2—2,4	20,2	0,3	0,3—3,0	58,2	6,3	1,4—14,0	39,2	2,7	0,4—4,4	39,8	3,0	0,6—5,9
Kleine Milchhallen .	45,4	3,1	0,05—0,5	71,7	2,2	0,4—4,0	43,0	—	—	52,7	10,1	1,4—14,0	53,2	5,1	0,6—6,2
Marktmilch	48,0	3,0	0,7—6,6	17,2	13,8	0,6—5,7	36,6	11,7	1,6—16,0	14,5	6,1	0,1—1,0	29,1	8,6	0,7—7,3
Dorfmilch	52,7	3,8	2,0—20,0	64,1	2,6	0,5—5,3	63,6	1,2	5,7—57,0	29,7	12,6	2,6—26,0	52,5	5,0	2,7—27,1
Bessere Milch . . .	42,6	1,5	0,6—6,0	38,0	5,5	0,03—0,3	71,0	7,7	—	12,2	21,6	0,06—0,6	41,0	9,1	0,2—2,3
Mittel	45,6	2,5	0,6—6,3	43,3	4,4	0,3—3,5	54,5	5,8	2,2—22,0	32,8	10,2	0,8—8,5	43,1	6,2	0,9—9,6
Pasteurisierte Milch	40,0	0,2	0,3—2,7	51,2	0,0	0,3—2,8	53,6	2,3	0,2—1,6	54,5	7,1	0,5—5,0	49,8	2,4	0,3—3,0

der untersuchten Milchproben dieser Gruppe erwiesen sich als sicher gefälscht. Die Gruppe III, d. h. die Marktmilch, ergab 11—16 Proz. Fälschung. In den übrigen Gruppen, mit Ausnahme einer Probe aus der Gruppe IV, wurde keine Fälschung konstatiert.

Von einigem Interesse erscheint es, den durchschnittlichen Fettgehalt der Milch nach den Jahreszeiten zu verzeichnen, wobei die einer Fälschung verdächtigen Proben natürlich ausgeschlossen sind. Der Fettgehalt beträgt für die Frühjahrsmilch — 3,77 Proz., für die Sommermilch 3,91 Proz. und für die Herbstmilch — 4,05 Proz. Für den Winter wurde der Fettgehalt leider wegen Ermangelung einer Zentrifuge nicht bestimmt.

Nachdruck verboten.

Methods for the Bacteriological Examination of Soils.

[Soil Bacteriological Laboratory, Iowa State College, Ames, Iowa.]

By **Percy Edgar Brown.**

It was natural from the fact that the idea of examining soils bacteriologically owed its inception to the development of the gelatine plate method for the isolation of pure cultures that the first investigations along this line should have been by the use of plate cultures, and therefore purely quantitative in nature. The results secured by the pioneers in this work demonstrated some facts of considerable interest, but it soon became evident that mere quantitative determinations of the bacteria in soils were inadequate to give any information regarding the relation of such organisms and their activities to the fertility of the soil.

The media available permitted of the development of only a few of the organisms normally present in soils, and the results secured gave no indication of the chemical changes occurring in the soil thru the agency of bacteria. Moreover, the fact was clearly recognized that the importance of bacteria in determining the fertility of a soil depended on their ability to transform the complex animal and plant residues in the soil into forms available for plant nourishment. Consequently the early investigators turned their attention very largely toward the study of methods of determining the physiological activities of groups of soil organisms which accomplished the solution of complex compounds. From the fact that nitrogen appeared to be the element most apt to be lacking from soils, the groups of bacteria which change insoluble proteins thru several stages into soluble, available nitrates were the first to be examined. Thus the ammonifying and nitrifying bacteria have received considerable attention. The nitrogen fixing organisms playing as they do so important a role in placing the inexhaustible supply of nitrogen in the atmosphere at the disposal of plants, and the denitrifying bacteria, at one time supposed to be of particular significance in causing losses of nitrogen from the soil, have also been studied.

Remy made the first attempt to study systematically methods for measuring the activities of special groups of soil organisms. He devised nutrient solutions of such composition that certain groups of organisms were favored to the exclusion of all others, and the products of the activities of these groups were then measured chemically.

Many experiments have since been carried out using Remy's solution method, and these are discussed so exhaustively in another publication[1]) that they need not be considered here.

The difficulties attendant upon the use of solutions are considerable. In the first place the physical conditions in solutions are so entirely different from those in soil that the bacteria introduced, whether in soil or in soil infusions, may be profoundly influenced. The growth of many species is undoubtedly prevented, the transference of the bacteria into the solutions may cause plasmolysis, reduction of virulence or physiological efficiency of important groups may occur, and species relationships will be entirely altered. Furthermore, the chemical composition of the soil is left out of account entirely and this has been shown to be of considerable importance in the study of bacterial activities in a soil[2]).

There is also the difficulty that small quantities of soil used for inoculation may not have the same properties as one hundred grams of fresh soil.

The studies of Stevens and Withers[3]) showed quite conclusively that the activities of various groups of organisms were quite different in soils from what they were in solutions, and they concluded that no "adequate knowledge of the efficiency of soil organisms in effecting chemical changes can be attained by tests in solutions".

Altho some investigators, notably Löhnis[4]) still cling to the solution method and advocate its use, most of the experiments now being conducted are carried out using soil itself as a medium according to the suggestions of Stevens[5]) and Withers and Lipman and Brown[6]). The contention of Löhnis that because decomposition processes going on in the soil take place in the soil water, therefore tests in solution are an adequate measure of such destructive processes, seems hardly warranted by the evidence at hand.

Sand has been suggested as a medium, but experiments have shown[7]) it to be quite unsatisfactory, particularly in ammonification studies, as ammonia is lost very rapidly by volatilization.

The soil itself, therefore, seems to be the most rational medium to be employed to measure the extent of bacterial activities occurring therein.

Many important questions immediately arise in considering the use of soil as a medium, and chief among these is the condition in which the soil should be used.

Sterilized soil, air-dry soil, or fresh soil may be employed, the two former being inoculated with fresh soil infusions, the latter allowing the organisms normally present to perform their natural functions.

Soil may be sterilized in the autoclave by steam under pressure, or by the use of various antiseptics. In the first case, great difficulty is experienced in obtaining complete sterilization of a large quantity of soil, and there may occur a transformation into more easily decomposable form and possible loss of nitrogen compounds, and the rearrangement of mineral compounds changing entirely the chemical character of the soil. It has been shown[1]) that sterilized soils subsequently inoculated did not recover completely their characteristic power of decomposing nitrogenous organic matter, and in the case of humus soils it increased the amount of nitrogen driven off in distillation with magnesia. The same objections pertain to the sterilization of the soil by means of antiseptics, particularly if, as is usually the case, the soil is rinsed with water to insure complete removal of the antiseptic. Furthermore, the physical properties of the soil, particularly the water-holding power, are vitally affected and acid products may be formed in considerable amounts.

---

[1]) Voorhees and Lipman, Bull. 194. Office of Expt. Stats. U. S. Dept. Agr. 1907.

[2]) Lipman and Brown, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 590.

[3]) Bull. 132. Bur. Chem. U. S. Dept. Agr. p. 34. — Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p, 776; Bd. 27. 1910. p. 169.

[4]) Landw. Jahrb. Bd. 42. 1912. p. 751.

[5]) Science. N. Ser. Vol. 27. 1908. p. 991.

[6]) New Jersey Stat. Rpt. 1908. p. 129.

[7]) Lipman, Brown and Owen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. p. 156. — Lemmermann, Fischer usw., Landw. Jahrb. Bd. 38. 1909. p. 319.

When air-dry soil is employed, the greatest objection, of course, is that it is only partially sterile and the species relationships are totally different from those in the corresponding fresh soil. There is also the objection that air-drying affects the chemical and physical character of the soil. The authors just cited[2]) have shown furthermore that drying changes the power of soil bacteria to accomplish their normal functions, for example, they found the nitrifying power considerably reduced but the denitrifying power unaffected.

Infusions of soil which must be used to inoculate both the sterilized and dried soils are objectionable for the reasons already mentioned.

Fresh soil, possessing none of the disadvantages mentioned above, offers, therefore, conditions as closely approximating field conditions as possible: the chemical, physical, and bacteriological conditions remain unaltered from field conditions at the beginning of the experiment. There is, of course, the difficulty of obtaining representative samples, but that may be accomplished by great care in taking the samples, thorough mixing, and frequency of sampling. The method which the author has employed with considerable success is completely described in a previous publication[3]).

There is the additional objection that the securing and mixing of the sample aerates the soil so thoroughly that increased bacterial activities may occur. This is probably the case, and if it were not for the necessity of thorough mixing in order to obtain representative samples portions of soil could be cut and transported to the laboratory for experimentation with little or no aeration occurring. As the matter stands, however, it is an open question which method is the more advisable, no comparisons having as yet been made.

As has already been noted, most of the investigators studying the physiological activities of bacteria in soils are agreed that fresh soil is the medium which should be employed.

The next question which arises is the choice of materials which must be added to soils when tested in the laboratory in order to permit of the accumulation of products of bacterial activities in sufficient quantities to be chemically estimated. For nitrification, ammonium sulfate has been commonly employed and has proved quite satisfactory. It may be applied in solution and hence is suitable for use with fresh soil. For azofication, mannite and dextrose, both of which may be added in solution have proven to be the best of the sugars in permitting the fixation of nitrogen. The most difficulty has been experienced in obtaining some substance which would be perfectly satisfactory for measuring the ammonifying power of a soil. Peptone proved quite unsatisfactory, which fact was attributed to enzyme action: and other nitrogenous materials such as urea, albumen, cottonseed meal and dried blood have been employed in the work of the various investigators already mentioned. Urea was found to be subject to the same objection as peptone, albumen caused difficulty because of its coagulation on sterilization, and the latter materials, cottonseed meal and dried blood, gave indications of greater value. The objections to both of these substances are the varying physical and chemical composition of different samples. It has been found that comparisons are difficult, in the case of dried blood, for example, without employing not only the same period of incubation and the same temperature, but also dried blood of the same composition. There is always the change upon sterilization in the composition of different samples to be considered, the difficulty of mixing thoroughly such materials with fresh soils, with the consequent impossibility of obtaining satisfactory duplicate determinations, and finally the difficulty in distillation due to foaming.

---

[1]) Lemmermann, Fischer usw., Landw. Jahrb. Bd. 38. 1909. p. 319.

[2]) Lemmermann, Fischer usw., l. c.

[3]) Research Bull. No. 5, Iowa Expt. Stat. Feb. 1912.

Considering all the facts just mentioned, the writer has attempted to eliminate some of the objectionable features of the methods from which at present investigators must choose. Realizing that the use of fresh soil presents conditions with the least objections, attention has been centered on its use and comparisons made of the results secured with those obtained thru the use of dry soil inoculated with infusions. The use of a new material, casein, has also been tested and its use as a measure of ammonification has given indications of considerable value.

Series A.

This series was planned to test the use of egg albumen as a measure of ammonification in fresh and air-dry soil. Four 100 gram quantities of fresh soil were weighed out and 10 c. c. of a 20 per cent albumen solution (= 2 gms albumen) were added to each.

The moisture content of the soil was found to be 20.00 per cent. Thus the final moisture content with the material added was 30.00 per cent, just about the optimum for the soil employed. Four 100 gram quantities of air-dry soil from the same source were weighed out and 10 c. c. of a 20 per cent solution of albumen added. Then 20 c. c. of a fresh infusion of the same soil was added to each. This infusion was prepared as usual by adding 100 grams to 200 c. c. of sterile water and shaking for five minutes. The moisture content of these samples was therefore the same as in the case of the fresh soil. Both lots were incubated for five days at room temperature.

The results are given in the subjoined table (Table 1 p. 65).

Glancing over these results we find that the determinations agreed very satisfactorily and the averages of the four results show that the ammonification of the albumen proceeded much more rapidly in the fresh soil than in the same soil air-dried and inoculated with a bacterial suspension from a fresh sample. The reason for this may be attributed to the change in the physical or chemical composition of the soil on air-drying or more likely to the fact that the species relationships in the air-dry soil, which were

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

undoubtedly considerably altered in the process of air-drying, caused development of the bacteria introduced in the soil infusions along different lines from that which would normally occur in fresh soils.

Table 1.

Lab. No.	Fresh Soil		Lab. No.	Air-dry Soil	
	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.		Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
1	90.64		5	40.98	
2	89.85		6	42.56	
3	95.76		7	39.01	
4	91.03	91.82	8	41.38	40.98

The egg albumen solution is shown to be fairly satisfactory and a decided improvement over the dried blood as it is practically impossible to mix the latter material with fresh soil thoroughly enough to secure satisfactory duplicates. The chief objections to the albumen is the difficulty of preparing a solution of it. This must be brought about in the cold, using sterile water, and considerable time is required to accomplish complete solution.

The much more rapid ammonification evidenced in this series when fresh soil was used beyond that brought about in air-dry soil made it desirable to determine whether the same differences in ammonifying power between field soils would be shown by the use of fresh and air-dry soils.

Series B.

This series was planned to test the use of egg albumen as a measure of ammonification in fresh, air-dry and sterilized soil, and also to compare the results obtained with this material with those secured by using dried blood. The soils from three plots differently treated was used to determine whether the same differences would be apparent by the different methods.

The plots from which the samples were drawn were numbered and treated as follows:

Plot 510 — Check
Plot 509 — 2 T ground limestone applied in 1911
Plot 508 — 3 T ground limestone applied in 1911.

The plots were all in corn during the season of the experiment.

Fresh soils were drawn from these plots with the usual precautions and 100 gram quantities weighed off and 10 c. c. of a 20 per cent albumen solution were added to each, the moisture content was determined and this was then adjusted in the samples to 30.00 per cent.

Air-dry soil from these plots was secured and albumen solution added to 100 gram portions, as before, and 20 c. c. of infusions of fresh soils were added. Air-dry soil sterilized in the autoclave was also employed, albumen solution and infusions being added as previously. These samples were then all incubated for six days at room temperature.

Tumblers were used for the fresh and air-dry samples, but the sterilized samples were kept in 500 c. c. Erlenmeyer flasks.

One hundred gram quantities of fresh soil similarly obtained received additions of 5 grams of dried blood, which was thoroughly mixed in, the moisture content was adjusted to 30.00 per cent, 75 per cent being figured the optimum for the organic matter, and the incubation period was seven days.

Air-dry soils from the plots were weighed off in 100 gram quantities, five grams of dried blood thoroughly mixed in, and 20 c. c. of infusions of the fresh soils were added. Again the incubation period was seven days at room temperature.

The moisture in the fresh soils was as follows:

510 — 20.00%
509 — 17.50%
508 — 15.00%.

The results obtained in this series are given in Table 2:

Table 2.
The Ammonification of Albumen.

Plot No.	Fresh Soil			Air-dry Soil + Infusions from fresh soils		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	1	65.81		9	59.90	
	2	71.72	68.76	10	59.90	59.90
509	3	86.70		11	70.93	
	4	88.27	87.48	12	65.81	68.37
508	5	103.64		13	76.06	
	6	104.43	104.03	14	70.14	73.10

The Ammonification of Albumen Continued.

Plot No.	Sterilized Soil + Infusions from fresh soils		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	15	59.50	
	16	64.24	61.87
509	17	66.20	
	18	72.12	69.16
508	19	74.87	
	20	75.27	75.07

The Ammonification of dried blood.

Plot No.	Air-dry Soil + Infusions from fresh soils			Fresh Soil		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	21	89.06		27	125.71	
	22	89.85	89.45	28	129.65	127.68
509	23	96.94		29	137.55	
	24	99.31	98.12	30	133.99	135.77
508	25	104.83		31	145.02	
	26	103.25	104.04	32	142.66	143.84

Studying the results given in the table several interesting points became evident.

In the first place we note that when albumen was used, just as in series A, larger amounts of ammonia were produced when the fresh soil was employed than when either air-dry or sterilized soil was used.

Furthermore, the greatest differences in the ammonifying power of the soils from the different plots was given in the fresh soil samples altho the effects of the treatment were shown both with the air-dry and sterilized soils. The amounts of ammonia produced when the air-dry and sterilized soils were employed were practically identical, and the same differences in the soils were evidenced. The amounts of ammonia produced with the sterilized soils were probably larger than they would have been in beakers for they were in Erlenmeyer flasks and consequently had a larger surface exposed to the air.

The ammonification of the dried blood in fresh soil was greater than in the air-dry samples, but the differences in the ammonifying power of the soils from the different plots were very slightly more pronounced.

Comparing the results secured using dried blood and albumen we find that the latter material permitted of a more distinct differentiation of the soils of the plots according to their ammonifying power. The amounts of ammonia were also smaller, due largely to the slightly shorter period of incubation and the difficulty in distilling was considerably lessened.

It is interesting to note that these plots were those which were used the previous season as a basis for the study of the effects of liming on field soils and that the effects noted in that work[1]) were confirmed here, the ammonifying power of the soil being much enhanced by the application of limestone. Furthermore, the differences were even more pronounced than they were the previous season, immediately following the application.

The agreement of duplicate determinations in this series is fair, in general the results using the albumen being much better than those using the dried blood.

The difficulty, already mentioned, which is encountered when albumen is used is very annoying and the time required to bring about a solution of the albumen is considerable, hence it seemed to the writer that a material which could be more easily dissolved would be much preferable, and casein suggested itself.

The following series was planned to determine the suitability of casein as a measure of ammonification.

Series C.

In this series a solution of casein was prepared, dissolving 20 gms. in 200 c. c. of water and sodium hydrate was added until solution was complete and the solution was then sterilized in the autoclave. 10 c. c. of this solution was added to each of six 100 gram portions of fresh soil drawn from the three plots already described and weighed off in duplicate in tumblers. The moisture content of the soils was determined and found to be as follows:

Plot 510— 20.00%
,, 509 : 24.00%
,, 508— 20.00%.

---

[1]) Brown, Research Bull. 5. Iowa Expt. Stat. 1912.

Enough sterile water was then added to the soils from plots 510 and 508 to make them correspond with that from plot 509, the content of the samples then being 34.00 per cent or somewhat above the optimum.

The samples were incubated for three days at room temperature and then analyzed with the following results:

Table 3.

Plot No.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	1	23.64	
	2	23.25	23.44
509	3	32.71	
	4	33.49	33.10
508	5	39.41	
	6	40.19	39.80

These results show that casein may be used very satisfactorily in this work and the differences which with other materials appeared in the soils of these plots were apparent also with casein.

Further tests of this substance seemed very desirable and the following series were planned with this in mind.

Series D.

Fresh soils were obtained from the plots and the moisture content determined. This was found to be:

Plot 510 — 20.00%
„ 509 — 20.00%
„ 508 — 19.50%.

100 gram portions were weighed off as usual and 10 c. c. of casein solution added. This solution was prepared more carefully than was the case in the preceding series as there was thought to be danger of using a slight excess of sodium hydrate and thus affecting the bacteria in the soil when the solution was added. One hundred grams of casein was dissolved in 1000 c. c. of water containing 70 c. c. of normal sodium hydrate, solution being complete and sterilization performed in the autoclave. The moisture content of the samples was adjusted to 30.00 per cent.

It was thought advisable also to include in this series a comparison of the use of a standard air-dry soil inoculated with infusions and air-dry soils from the special plots inoculated with infusions with fresh soil and with each other. Consequently a sample of soil from an untreated plot was obtained and air dried, and 100 gram portions of it weighed off in tumblers; 10 c. c. of the casein solution prepared as described were added and 20 c. c. of a 5-minute infusion of fresh soils from the plots were added. A moisture content of 30.00 per cent was thus secured. Similarly two one hundred gram portions of air-dry samples of soil from each of the three plots were weighed off, 10 c. c. of casein solution added and 20 c. c. of 5-minute infusions of fresh soils from the same plots were added. All these samples were incubated for three days at room temperature.

A comparison series was started at the same time using fresh soil, air-dry standard soil and air-dry special soils, with dried blood added. The

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

moisture content of the fresh soil samples was adjusted to 30.00 per cent, 75 per cent being allowed as the optimum for the dried blood. Infusions of fresh soils were used with the air-dry standard and air-dry special soils and the moisture content of these brought up to 30.00 per cent.

The incubation period for these samples was six days at room temperature.

The results obtained upon distillation of the ammonia formed in the samples with both the casein and dried blood are given in the following table.

Table 4.

The Ammonification of Casein.

Plot No.	Fresh Soil			Air-dry Standard Soil + infusions of fresh soils			Air-dry Special Soils + Infusions of fresh soils		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	1	24.32		7	33.35		13	27.08	
	2	23.15	23.73	8	32.96	33.15	14	25.90	26.49
509	3	30.61		9	38.06		15	31.00	
	4	31.39	31.00	10	38.85	38.45	16	30.61	30.80
508	5	45.71		11	41.99		17	43.35	
	6	44.92	45.31	12	41.20	41.59	18	42.57	42.96

The ammonification of dried blood.

Plot No.	Fresh Soil			Air-dry Standard Soil + infusions of fresh soils			Air-dry Special Soils + Infusions of fresh soils		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	19	107.91		21	153.82		27	144.80	
	20	112.23	110.07	22	151.47	152.64	28	140.49	142.64
509	21	129.10		23	160.49		29	152.25	
	22	125.18	127.14	24	163.63	162.06	30	158.53	155.39
508	23	156.18		25	170.30		31	172.26	
	24	155.39	155.78	26	167.55	168.92	32	167.95	170.10

In looking over the results given in the table several facts stand out very distinctly. In the first place it is evident that the casein solution was quite satisfactory as a measure of ammonification. It is also clear that the casein solution permitted of a greater differentiation in the soils of plots differently treated than the dried blood. The amounts of ammonia produced were smaller and there was less difficulty therefore in the distillation. The duplicate determinations agreed remarkably well, much better than it is possible to make the determinations with dried blood agree.

Comparing the results secured using fresh soil, air-dry standard soils and air-dry special soils, the differences in the ammonifying power of the three soils were shown much more distinctly with the fresh soil when either casein or dried blood was used.

The air-dry special soils showed somewhat greater differences than the air-dry standard soils. Evidently the chemical composition of the soil was of considerable importance as has already been mentioned.

Another fact which is quite noticeable is the excellent agreement of the duplicate determinations when the casein was used. In fact, the duplicates agree like a chemical determination and this is in striking contrast with the large variations which frequently occur in the duplicates when dried blood is employed.

Furthermore, the distillation is a much simpler process. The foaming which is so troublesome with the dried blood is very much reduced and causes little trouble. The short incubation period of the casein treated soils is also a point of considerable importance, as in formulating a practical method the time element is an important factor in determining its value.

Series E.

When fresh soils are employed, the problem of the proper regulation of the moisture conditions for optimum bacterial activities must be faced.

The variation in moisture content of different plots of the same series of experiments may be quite large and the question arises whether in testing the soils the moisture should be allowed to remain as it is in the field, or whether it should be adjusted to the optimum. In the preceding series, the latter method was followed and it is undoubtedly the most rational method as the ammonifying power of a soil means the power of the soil to produce ammonia under optimum conditions.

Altho the moisture content of soils may vary considerably from plot to plot in the same series, in field plots carefully laid out, as they should be, on uniform land, well drained etc., the variations in moisture content may be slight. It was deemed advisable therefore to determine whether slight variations in moisture conditions would materially affect the results. Fresh soils were consequently drawn from the three plots used in the preceding series and the moisture content determined as previously by drying carefully in the hot air oven. 100 gram quantities of the fresh soils were weighed off and 10 c. c. of casein solution added to each.

In duplicates of each soil the moisture content of the soil was adjusted to the optimum, while in other duplicates of the same soil no adjustment was made.

The moisture content of the fresh soils was:

Plot 510 — 20.00%
„ 509 — 19.00%
„ 508 — 18.50%

The samples were incubated for three days at room temperature and than the ammonia formed was distilled and collected in the usual way.

The results obtained are given in the following table (Table 5, p. 71).

The results given in this table show that a variation in moisture content of one and one half per cent (1½ %) seemed to have no influence on the differences in the ammonifying power of plots differently treated. In fact, the figures obtained are almost identical.

It is evident therefore that normal differences in the moisture content of field plots well laid out on level ground seldom exceeding two per cent are negligible.

From the facts however that in planning field plots it is extremely difficult often to have just the ideal location and that much larger differences in moisture than two per cent may occur, it is believed that for ammonification tests the water content of the soil should be ascertained and sterile

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

water added to bring it up to the optimum. For instance in this series of experiments plot 510 always contained slightly more water than the other two, a difference of 5 per cent, showing in Series A. Plot 510 is on lower ground and consequently would have a tendency to be more moist.

Table 5.

Plot No.	Moisture Content Adjusted to the optimum			Moisture content unaltered		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	41	23.75		47	22.96	
	42	22.96	23.35	48	22.18	22.57
509	43	34.92		49	34.92	
	44	34.14	34.54	50	35.32	35.12
508	45	38.85		51	39.63	
	46	39.63	39.24	52	38.85	39.24

Unfortunately it was not possible to test the effect of larger variations than two per cent of moisture on the ammonification of casein, but it is a safe assumption that quite appreciable effects might be evidenced by differences of more than 5 per cent.

The results secured in this series with the casein check those of the preceding series and again we note the remarkable agreement of the duplicate determinations.

Series F.

One further point was considered worthy of testing and that was whether it would be feasible to employ smaller amounts of casein and shorten the incubation period, and secure satisfactory results. As has been noted the time factor is of considerable importance in such experiments, and the shorter the necessary period of incubation, the better.

A further test was also included comparing the use of fresh soil with air-dry standard and air-dry special soils. Tests of a smaller amount of albumen solution and shorter period of incubation were also carried out in a similar way, and for the sake of comparison tests using dried blood were made as usual.

The fresh soils were drawn as previously to one lot of the three soils in duplicate, 5 c. c. of the casein solution were added, to another 5 c. c. of a 10 per cent albumen solution were added and to the third lot 5 grams of dried blood.

The moisture content of the fresh soils was determined and found to be as follows:

Plot 510 — 18.50%
„ 509 — 17.00%
„ 508 — 16.50%.

All the fresh samples received additions of sterile water to bring the content up to 30.00 per cent.

The infusions were prepared as usual and added to the air-dry samples. The samples receiving casein were incubated for two days, those receiving albumen three days, and those with dried blood six days.

The results are given in the following table:

Table 6.

The ammonification of Casein.

Plot No.	Fresh Soil			Air-dry Standard Seil + special infusions			Air-dry Special Soils + special infusions		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	107	7.46		113	8.24		119	9.42	
	108	8.63	8,04	114	10.59	9.41	120	9.42	9.42
509	109	11.38		115	9.42		121	10.59	
	110	11.38	11.38	116	11.38	10.40	122	11.38	10.98
508	111	13.73		117	12.16		123	lost	
	112	15.30	14.51	118	13.34	12.75	124	13.73	13.73

The ammonification of albumen.

Plot No.	Fresh Soil			Air-dry Standard Soil + special infusions			Air-dry special Soils + special infusions		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	125	3.92		131	13.73		137	9.03	
	126	4.42	4.17	132	12.95	13.34	138	(lost)	9.03
509	127	7.46		133	16.48		139	11.38	
	128	7.46	7.46	134	16.09	16.28	140	11.38	11.38
508	129	10.99		135	20.01		141	19.23	
	130	10.20	10.59	136	(lost)	20.01	142	17.27	18.25

The ammonification of dried blood.

Plot No.	Fresh Soil			Air-dry Standard Soil + special infusions			Air-dry Special Soils + special infusions		
	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.	Lab. No.	Ammonia mgs N.	Av. mgs N.
510	143	105.16		149	154.21		155	144.40	
	144	116.15	110.65	150	151.07	152.64	156	145.97	145.18
509	145	124.39		151	158.92		157	160.10	
	146	136.56	130.47	152	163.24	161.08	158	149.90	155.00
508	147	151.86		153	169.52		159	175.79	
	148	155.39	153.62	154	171.87	170.69	160	175.01	175.40

The results obtained here demonstrate again the fact that fresh soil allowed of the greatest differentiation in the soils of the plots.

Furthermore, the casein and albumen both gave better results than the dried blood; that is, they showed greater differences between the soils than did dried blood.

Comparing the results using air-dry standard soil inoculated with special infusions and air-dry special soils similarly inoculated, we find that the latter method showed greater differences in the soils altho the former showed differences which were in the same direction.

The smaller amount of casein and albumen used here seem hardly as satisfactory as the larger amount previously employed. Again the advantages of the casein are shown by the good agreement of duplicate determinations. Albumen, as has been noted, gives good results, but the difficulties attendant upon the preparation of the solution are a distinct detriment to its use.

Conclusions.

1. Fresh soil is the most rational medium for studying the physiological activities of soil bacteria.
2. Fresh soil permits of the greater differentiation in field soils, differently treated, according to the activities of the ammonifying bacteria than air-dry soils inoculated with infusions.
3. Air-dry soils from particular plots inoculated with infusions of fresh soils show greater differences than an air-dry standard soil inoculated with infusions from the various soils. Evidently the chemical character of the soil is of considerable moment when considering its ammonifying efficiency.
4. An albumen solution may serve as a measure of ammonification and is preferable to dried blood, but it possesses the disadvantage that it is very difficult to prepare.
5. A solution of casein proved quite satisfactory as a measure of ammonification possessing none of the disadvantages of the other nitrogenous materials, and allowing of greater differentiation among different soils.
6. Slight variations in moisture conditions in field soils do not seem to affect materially the ammonification of casein. It is advocated, however, that in view of the large variations which may occur in the moisture content of field soils, that the conditions, be adjusted to the optimum in the tests.
7. Ten c. c. of a 10 per cent solution of casein is found to be the best amount to use per 100 gms. of fresh soil and the optimum incubation period at room temperature is three days.

Nachdruck verboten.

Anguillula Silusiae n. sp., eine neue, in den sogenannten „Bierfilzen“ lebende Art der Gattung Anguillula Ehrb.

Von Dr. **J. G. de Man,** Jerseke (Holland).

Eine neue Art der Gattung Anguillula Ehrb., wie sie im Jahre 1910 von mir neu charakterisiert worden ist (Zool. Jahrb. Abt. f. Syst. Bd. 29. p. 362). Der typische Vertreter der Gattung ist das allgemein bekannte Essigälchen, Ang. aceti (Müll.); zu ihr gehören dann noch die Varietät dryophila Leuck. des Essigälchens, sowie eine zweite Art, die Ang. Ludwigii de Man, welche beide in dem weißen Schleimfluß der Eichen leben. Als dritte Art kommt nun die Ang. Silusiae hinzu, welche der Ang. Ludwigii nächstverwandt ist, sich aber durch die Gestalt der Spicula auf den ersten Blick unterscheidet.

Körperlänge des ♂ 1,9 mm, des ♀ 2,56 mm. — Verhältnis zwischen der Körperlänge und der mittleren Dicke beim ♂ 35—40, beim ♀ 30—35; Verhältnis zwischen der Körperlänge und der Länge des Ösophagus, die Mundhöhle mitgerechnet, beim ♂ 8—9, beim ♀ 10—12; Verhältnis zwischen der Körperlänge und der Länge des Schwanzes bei ♂ und ♀ 12—15. — Allgemeine Körpergestalt wie bei Ang. Ludwigii; der Schwanz zeigt bei Männchen und Weibchen ungefähr dieselbe Form und läuft in eine sehr feine Spitze aus. Haut nicht nur äußerst fein quergeringelt, wie bei Ang. Ludwigii, sondern auch schön fein längsgestreift. Seitenmembran schmal. Kopfende nicht von 6, sondern von 3 wenig hervorragenden Lippen gebildet, mit zwei Kreisen von Papillen. Mundhöhle bei 1,5 mm langen Tieren 14—15 μ tief, genau so wie bei Ang. Ludwigii gebildet. Die Länge der Spicula, d. h. die lineare Entfernung der beiden Enden derselben, beträgt 55—62 μ, so daß diese Organe 2½—3-mal so lang sind wie die Spicula der Ang. Ludwigii: während sie bei dieser Art nur $^1/_7$ der Länge des Schwanzes messen, erscheinen die Spicula bei Ang. Silusiae bedeutend größer, ungefähr halb so lang wie der Schwanz. Die Spicula sind gleich, ein wenig gebogen, das proximale Ende erscheint hakenförmig, das distale stumpf. Akzessorisches Stück nachenförmig, 3-mal so lang wie breit und halb so lang wie die Spicula. Sieben Paare von Papillen beim Männchen, wie bei Ang. Ludwigii angeordnet. Die Art ist vivipar, wie die anderen Vertreter der Gattung. Bei sehr alten Weibchen ist die Entfernung der Geschlechtsöffnung vom After 3-mal oder etwas mehr als 3-mal so lang wie der Schwanz, bei Exemplaren mittlerer Größe etwas mehr als 2-mal und bei 1,18 mm langen Tieren gerade 2-mal so lang. Geschlechtsröhre wie bei Ang. Ludwigii, aber das blinde Ende des Ovariums reicht gewöhnlich bis dahin, wo der Darm in das Rectum übergeht.

Anguillula Silusiae lebt zahlreich in den Bierfilzen in der Stadt Schleusingen (latinisiert Silusia), wo sie von Herrn Carl Jahn entdeckt wurde.

Eine mehr ausführliche Beschreibung mit Abbildungen wird später in der Festschrift der „Société royale Zoologique et Malacologique de Belgique“ erscheinen.

Nachdruck verboten.

Die Gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung.

Zweite Mitteilung[1]).

[Aus dem hygienischen Institut der Universität Utrecht.]

Von Prof. Dr. **C. Eijkman.**

Die widersprechenden Beurteilungen, welche meiner Methode seitens der Nachuntersucher zuteil geworden sind, veranlassen mich, sie nochmals zur Sprache zu bringen und den Versuch zu machen, an der Hand der seit meiner ersten Mitteilung über diesen Gegenstand gesammelten Erfahrungen die Gründe jener Verschiedenheiten aufzuklären.

Zunächst sei daran erinnert, daß mein Ausgangspunkt der war, durch Anwendung einer höheren Züchtungstemperatur diejenigen coli-ähnlichen Arten auszuschalten, welche weder direkt, noch indirekt aus dem Darme stammen und mithin nicht zur Spezies Bacillus coli strictu sensu gerechnet zu werden verdienen. Bei der Ausarbeitung der Methode stellte sich dann zwar heraus, daß meine Voraussetzung nicht in jeder Beziehung zutraf, indem einerseits auch andere thermotolerante Gärungserreger als B. coli, wenn auch in einer verschwindenden Minderheit der Fälle, zur Entwicklung kamen und andererseits nicht alle coli artigen Faecesbakterien sich als thermotolerant erwiesen, immerhin blieb aber die experimentell durch ein ziemlich ausgebreitetes Beobachtungsmaterial erhärtete Tatsache, „daß Wasser unverdächtigen Ursprungs bei 46° nicht reagierte, wohl hingegen und ohne Ausnahme diejenigen Wässer, bei denen man von vornherein annehmen konnte, daß Fäkalien hineingelangen.“

Ich habe daher meine Methode absichtlich nicht als eine Coli-Probe, sondern als eine Gärungsprobe zum Nachweis fäkaler Verunreinigung bezeichnet. Daß sie ohne weiteres imstande sei, in allen Fällen die sichere Entscheidung zu bringen, ob eine solche Verunreinigung vorliegt oder nicht, möchte ich selbstverständlich nicht behaupten. Es ist nun einmal die Bakteriologie keine mathematische Wissenschaft und eine schablonenhafte und einseitige Anwendung der Methode ist von mir niemals befürwortet worden. Im Gegenteil habe ich den Nachdruck gelegt auf eine möglichst eingehende Untersuchung der Prise d'eau. Die Kenntnis der lokalen Verhältnisse ist, auch bei Anwendung meiner Methode, schon darum notwendig, weil diese ihrer Natur nach nicht für alle Fälle gleich geeignet ist. Wo notgedrungen Wasser getrunken werden muß, das offenkundig einer fäkalen Verunreinigung mehr oder weniger ausgesetzt ist, wie von den Dächern aufgesammeltes Regenwasser und Oberflächenwasser in bewohnten Gegenden überhaupt, hat es keinen Zweck, dieselbe noch einmal bakteriologisch mittels einer qualitativen Probe nachzuweisen. Wohl aber kann es hier am Platz sein, den Grad der Verunreinigung durch quantitative Versuche festzustellen, und es hat vielleicht Oettinger[2]) recht, wenn er bemerkt, daß für solche Fälle — es handelt sich bei ihm mehr speziell um die Sandfilterkontrolle — die Abgrenzung des B. coli gegenüber seinen verwandten Arten nicht dieselbe

---

[1]) Vgl. diese Zeitschrift Bd. 37. 1904.

[2]) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 71. 1912. p. 127.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ausschlaggebende Bedeutung hat, wie für die Beurteilung des Colibefundes bei Brunnen- und Grundwasseruntersuchungen. Hier aber darf man, meiner Erfahrung nach, die 46°-Probe als eine qualitative auffassen und somit das Wasser als verdächtig betrachten, falls überhaupt thermotolerante Gärungsorganismen darin nachgewiesen werden. Weniger leicht ist selbstverständlich die Entscheidung im entgegengesetzten Falle. Auch davon abgesehen, daß ein negatives Ergebnis allenfalls eine schwache Grundlage darstellt für sichere Schlüsse, ist die Möglichkeit, daß das Wasser zu einer anderen Zeit verunreinigt befunden werden könnte, nicht ausgeschlossen, denn unreine Zuflüsse nach einem Brunnen oder einer Quelle brauchen nicht durchgehend stattzufinden. Ich habe denn auch gerade in dieser Beziehung nicht unterlassen, auf die Notwendigkeit einer wiederholten Untersuchung in Verbindung mit einer lokalen Inspektion hinzuweisen.

Man hat nun der 46°-Probe vorgeworfen, daß sie weniger empfindlich sei, als die Züchtung bei 37°. Indem ich dies bis zu einem gewissen Grade zugebe, möchte ich aber gleich dazu bemerken, daß diese ihre schwache Seite andererseits doch geradezu ihr Vorzug ist. Denn in demselben Maße, wie die Methode durch Ausschluß der weniger thermotoleranten Gärungsorganismen an Empfindlichkeit verliert, gewinnt sie auch an Zuverlässigkeit. Dazu kommt, daß dem Mangel an Empfindlichkeit einigermaßen durch Verwendung größerer Wassermengen abzuhelfen ist.

Wie schon bemerkt, will ich nicht verneinen, daß in Faeces neben thermotoleranten Gärungsorganismen auch solche vorkommen, welche die Temperatur von 46° nicht vertragen; ich sah aber davon ab, diese als Indikator fäkaler Verunreinigung zu verwenden, weil sie nicht oder schwerlich gegen ihre Doppelgänger in der Außenwelt abzugrenzen sind, deren fäkaler Ursprung gar nicht feststeht[1]). Es wird mithin das auf Erfahrung begründete Prinzip[2]) der Methode nicht im mindesten davon berührt, daß, wie einige Untersucher angeben[3]) und von mir nicht bestritten wird, Coli-Stämme aus Faeces gezüchtet werden können, welche bei 46° nicht wachsen oder wenigstens Traubenzucker nicht vergären. Es wäre dem nur noch entgegenzuhalten, daß solche Organismen auch in einwandfreien Wässern vorkommen und daß sie deshalb nicht nur nicht als Indikator fäkaler Verunreinigung dienen können, sondern um Verwechslungen zuvorzukommen, geradezu ausgeschlossen werden sollen.

Wie ich schon früher mitteilte, ergab eine Menge von einwandfreien Wässern, bei welchen die 46°-Probe negativ ausfiel, Gärung bei 37°. Eine Ausnahme machte derzeit das chemisch und bakteriologisch außerordentlich reine Utrechter Leitungswasser. Es handelt sich hier um eine geschlossene Wasserleitung, welche ihr Wasser mittels etwa 20 m tiefen Rohrbrunnen dem öden Heideboden entnimmt. Dieses Wasser ergab nicht bloß bei 46°, sondern auch bei gewöhnlicher Brutwärme kein Gas im Gärkolben. Seitdem habe ich aber auch mit diesem Wasser, sogar in Mengen von nicht mehr als 10 ccm (geringere Mengen wurden nicht in Untersuchung genommen), einige Male bei 37° ein positives Resultat bekommen, niemals dahingegen bei 46°. Ich konnte hier coliforme Stäbchen aus den bei 37° gehaltenen Gärkölbchen isolieren, die auf Endonährboden, Gelatine, Kartoffel und in Neutralrotagar typisch wie B. coli wuchsen, Milch zur Gerinnung brachten und in Peptonbouillon schwache Indolbildung hervorbrachten. Bei Temperaturen über 40° fand aber kein Wachstum mehr statt.

---

[1]) Eijkman, Pharmac. Weekblad 1906. No. 35.

[2]) Nicht zu verwechseln mit der Premisse der Methode, denn auch, wo diese als verfehlt sich herausstellt, kann dennoch die experimentelle Grundlage richtig sein. Als ein klassisches Beispiel dafür dürfte die Wassermannsche Reaktion angeführt werden.

[3]) Vgl. Hehewerth, diese Zeitschr. Abt. I. Orig. Bd. 65. 1912.

Wenn man den Colibefund bei 37° als ausschlaggebend betrachten wollte, hätte also dieses Wasser beanstandet werden müssen, wozu im übrigen aber nicht der geringste Grund vorlag.

Auch Hilgermann[1]) fand in völlig einwandfreien Wässern Coli-Bazillen, die Traubenzucker bei 37°, nicht aber bei 46° vergärten. Mit Recht hält er mithin ihr Vorhandensein an sich für die Beurteilung der Güte eines Wassers ohne jede Bedeutung. Thermotolerante Gärungsorganismen fand er hingegen nur in ihrem Ursprung nach verdächtigen Wässern.

Einen für mich unbegreiflichen Standpunkt nimmt Fromme[2]) ein. Nach ihm kann als feststehend angenommen werden, daß bei 37° Dextrose vergärende, nicht zur Coli-Gruppe gehörige Bakterien häufig in Wasser gefunden werden, und daß ihr Vorkommen nicht unbedingt zu einer Beanstandung des betreffenden Wassers führen darf. Nichtsdestoweniger empfiehlt er die Anreicherung in 1proz. Dextrosebouillon bei 37° als zum Nachweis von Colibazillen in Wasser besonders geeignet.

Es geht meines Erachtens aus dem Angeführten zur Genüge hervor, daß die Züchtung bei höherer Temperatur den Vorzug verdient, damit man um so besser vor unliebsamen Überraschungen und Fehlschlüssen sichergestellt ist, und daß man dafür die etwas geringere Empfindlichkeit der Probe mit in den Kauf zu nehmen hat.

Was übrigens diese Empfindlichkeit anbetrifft, so ist sie nicht so gering, wie von einigen Nachuntersuchern behauptet worden ist, vorausgesetzt, daß unter den nötigen Kautelen — ein Punkt, worauf ich noch zurückkommen werde — gearbeitet wird. Nicht nur, daß, wie auch Worthmann[3]) fand, sich aus jedem Stuhl mindestens ein Stamm züchten läßt, bei dem die 46°-Probe positiv ausfällt, sondern meiner Erfahrung nach gelingt das noch bei Verwendung ganz winziger Faecesmengen. Ich habe Leitungswasser, welches für sich eine negative 46°-Probe gab, mit verschwindenden Faecesmengen (z. B. im Verhältnis von 7 500 000 : 1) geimpft und damit in Kolben von 100 ccm Inhalt regelmäßig bei 46° Gärung bekommen. Mit flüssigem Grubeninhalt (Jauche) war das in einer Verdünnung von 450 000 : 1 noch der Fall. Von dem verhältnismäßig ziemlich reinen Grabenwasser der Stadt Utrecht, welches in der Plattenkultur bei 22° etwa 30 000 Kolonien pro ccm ergibt, genügt, wie ich früher schon mitteilte, eine Menge von 0,01 ccm, um regelmäßig bei 46° Gärung hervorzubringen. Bei Verwendung von drei Gärungskolben von je 100 ccm Inhalt ist somit eine Beimischung von Grubenwasser noch in einer Verdünnung von 30 000 : 1 sicher nachzuweisen.

Mit diesen Befunden stimmen die Beobachtungen einiger Forscher gut überein.

Christian[4]) erhielt mit 0,000 001 ccm Berliner Kanaljauche, 0,0001 ccm filtriertem Rieselwasser, 0,0002 ccm Wasser der Panke und 0,001 ccm Spreewasser stets einen positiven Ausfall der 46°-Probe.

---

[1]) Klin. Jahrb. Bd. 22. 1909.

[2]) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 65. 1910.

[3]) Mitteil. a. d. Kgl. Prüf.-Anst. f. Wasserversorg. 1907. H. 9.

[4]) Arch. f. Hyg. Bd. 54. 1905.

Auch Thomann[1]) sah nach Impfung mit kleinsten Mengen von Warmblüterfaeces oder Jauche (1—2 Platinösen einer tausendfachen Verdünnung) regelmäßig bei 46° Gärung eintreten. Er konnte fast durchweg aus der gärenden Flüssigkeit B. coli in Reinkultur isolieren, in ganz wenigen Fällen waren noch Diplokokken nachzuweisen, während durch die Anreicherung nach Freudenreich bei 37° eine nachherige Isolierung des B. coli schwieriger war, weil eben neben ihm noch eine ganze Anzahl anderer Bakterienarten gewachsen waren.

Auch Bulir[2]) findet die Empfindlichkeit der 46°-Probe so groß, daß er noch in 0,01 ccm des bei der Karlsbrücke in Prag geschöpften Moldauwassers eine deutliche positive Reaktion wahrnehmen konnte.

Wenn nun diesen nicht wegzuleugnenden Tatsachen gegenüber andere Forscher zu wenig zufriedenstellenden Ergebnissen gelangt sind, so kann das meines Erachtens wohl nicht anders als daran liegen, daß ihre Versuchsanordnung eine weniger zweckentsprechende war.

Es könnte hier zunächst an ungünstige Temperaturverhältnisse, des weiteren aber an eine ungeeignete Beschaffenheit der Nährlösung gedacht werden. Auf diese beiden Punkte möchte ich etwas ausführlicher eingehen.

Was die Temperatur anbetrifft, so bin ich auf rein empirischem Wege schließlich dazu gekommen, dieselbe auf 46° festzusetzen. Diese ist, meiner Erfahrung nach, als die obere Grenze zu betrachten, wobei einerseits die Probe noch genügend empfindlich ist zum Nachweis fäkaler Verunreinigung und andererseits die Entwicklung von Begleitbakterien möglichst unterdrückt wird. Es liegt in der Feststellung einer Grenzziffer immer etwas willkürliches und, was bei vielen elektiven Verfahren der Fall ist, gilt auch hier, daß nämlich das Mittel, wodurch dem Aufkommen unerwünschter Bakterien entgegengewirkt wird, auch denjenigen Mikroorganismen gegenüber, worauf gefahndet wird, nicht ganz unschädlich ist. Es ist möglich, daß weitere Untersuchungen ergeben werden, daß man auch mit einer etwas niedrigeren Temperatur auskommen kann, und daß die Methode dabei noch an Empfindlichkeit gewinnt, ohne an Zuverlässigkeit einzubüßen. Ein Fingerzeig in dieser Richtung dürfte damit gegeben sein, daß die von mir in einwandsfreien Wässern angetroffenen Gärungsmikroorganismen bereits bei 42° nicht mehr wuchsen. Wie dem auch sei, einstweilen möchte ich auf Grund eigener Erfahrung an einer Züchtungstemperatur von 46° festhalten, vorausgesetzt, daß die Temperaturregelung peinlich genau geschehen kann. Wo dies nicht der Fall ist und gelegentlich Schwankungen von ½° und mehr nicht ausgeschlossen sind, wird man vorsichtiger tun, auf 45° einzustellen.

Ich erachte es als nicht unwahrscheinlich, daß unbefriedigende Resultate Anderer zum Teil auf Fehler in der Wärmeregulierung (Überschreiten der Grenztemperatur) zurückzuführen seien. Außerdem aber kann hier eine ungünstige Beschaffenheit der Nährlösung eine Rolle spielen. Diesbezüglich habe ich Folgendes in Erfahrung gebracht:

Beim Erhitzen der Stammlösung (zum Zweck der Sterilisierung) nimmt dieselbe eine braune Farbe an und es tritt zugleich damit eine sauere Reaktion auf. Es handelt sich hierbei offenbar um ein Karomelisieren des Traubenzuckers, welche nachweislich durch das gleichzeitig anwesende Witte-sche Pepton stark gefördert wird. Denn wenn eine 10proz. Traubenzuckerlösung (gleichviel, ob mit oder ohne Kochsalz) für sich erhitzt wird, findet die erwähnte Veränderung in viel geringerem Grade statt. Wahrscheinlich ist es die alkalische Reaktion des Handelspeptons, welche Schuld hat an dieser Erscheinung, denn auch eine schwache Alkalisierung der Zuckerlösung mittels Soda beschleunigt bei nachfolgender Erhitzung die Braunfärbung und das Auftreten einer saueren Reaktion in nicht geringem Maße.

---

[1]) Hyg. Rundsch. 1907. No. 14.

[2]) Arch. f. Hyg. Bd. 62.

Bei vorsichtigem Sterilisieren ist jene Veränderung der Stammlösung nicht so ansehnlich, daß sie störend wirkt. Es ist mir aber einmal passiert, als ich eine infolge längeren Sterilisierens stark dunkelbraun verfärbte Stammlösung benutzte, daß damit ganz ungenügende Resultate erhalten wurden. Es stellte sich dann heraus, daß sie eine sauere Reaktion hatte, welche einem Säuregrad von ungefähr N/50 entsprach. Obwohl derselbe durch die Vermischung der Stammlösung mit dem zu untersuchenden Wasser bis auf etwa ein Zehntel seines ursprünglichen Wertes abgeschwächt wurde, war er dennoch die eigentliche Ursache, daß die Gärung bei 46° nicht eintrat, denn, als die Stammlösung mit Natronlauge neutral reagierend gegen Lackmus gemacht worden war, wurde sie sofort wiederum gebrauchsfähig.

Ich vermute nun, daß diese unliebsame Veränderung, welche die Stammlösung bei zu energischem Sterilisieren erfährt, auch anderen Untersuchern einen Streich gespielt hat. Eine dahin gehende Andeutung finde ich bei Koning[1]), der erwähnt, daß, während mit menschlichen Faeces verunreinigtes Wasser bei Anwendung meiner Methode öfters negativ reagierte, er mit schwach alkalischer Glykosebouillon fast immer ein positives Ergebnis hatte. Es ist zu bedauern, daß Koning anscheinend nicht auf den Gedanken verfallen ist, die Reaktion der von ihm zu meiner Probe benutzten Stammlösung zu prüfen.

Ich muß daher jedem Nachuntersucher dringend raten, dafür Sorge zu tragen, daß nur neutral oder schwach alkalisch reagierende Stammlösung zu der 46°-Probe benutzt wird. Ist die Reaktion infolge des Sterilisierens sauer geworden, so soll sie mittels Natronlauge gegen Lackmus abgestumpft werden.

Die Bulirsche Modifikation meiner Methode kann ich nicht als eine Verbesserung, sondern nur als eine unnötige und gelegentlich zu Fehlschlüssen führen könnende Komplikation betrachten.

Einmal geht sie von der Voraussetzung aus, welche nachgewiesenermaßen nicht immer zutrifft, daß nur eine einzige Bakterienart in den Gärungskolben bei 46° zur Entwicklung kommt, auf welche Bulir eventuell sowohl die Gasbildung, als die Säurebildung, sowie die Reduktion des Neutralrots zurückführt. Wie aber De Waal[2]) gezeigt hat, kommt es tatsächlich vor, daß neben einem Gasbildner noch ein zweiter, nicht gasbildender Mikroorganismus sich entwickelt, der für etwaige Säureproduktion und Reduktion des Neutralrots verantwortlich zu machen ist.

Dann auch vernachlässigt Bulir, indem er bloß auf B. coli fahndet, die anderen thermotoleranten Gärungserreger, die, wenn auch verhältnismäßig selten, bei fäkaler Verunreinigung vorkommen können[3]), und, meiner Erfahrung nach, in einwandfreien Wässern fehlen.

---

[1]) Pharmac. Weekblad. 1907. No. 1 u. 2.

[2]) Pharmac. Weekblad. 1913. No. 4.

[3]) Vgl. auch Worthmann a. a. O.

Schlußfolgerungen.

1. Die Verwendung der Gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung beruht auf der empirischen Tatsache, daß in Warmblüterfaeces regelmäßig thermotolerante Gärungsorganismen vorkommen und daß diese in einwandfreiem Wasser zu fehlen pflegen.

2. Die Methode erhebt keinen Anspruch darauf, eine reine Coliprobe zu sein. Der gegen sie erhobene Einwand, daß es echte Colistämme gibt, welche nicht thermotolerant sind, wird damit hinfällig, um so mehr, als ähnliche Stämme auch in nicht zu beanstandenden Wässern vorkommen können.

3. Die Empfindlichkeit der Methode ist trotz ihres Exklusivismus eine recht zufriedenstellende. Entgegengesetzte Angaben dürften auf fehlerhafter Versuchsanordnung beruhen (ungenaue Temperaturregulierung, Verschlechterung der Nährlösung infolge zu starker oder zu lange dauernden Erhitzens bei der Sterilisierung).

4. Die Bulirsche Modifikation der Methode ist nicht als eine Verbesserung derselben zu veranschlagen.

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Brown, Percy Edgar, Methods for the Bacteriological Examination of Soils, p. 61.
Eijkman, C., Die Gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung, p. 75.
de Man, J. G., Anguillula Silusiae n. sp., eine neue, in den sogenannten „Bierfilzen“ lebende Art der Gattung Anguillula Ehrb., p. 74.
Will, H., Beiträge zur Kenntnis der sogenannten schwarzen Hefen, p. 1
—, Saccharomyces anamensis, die Hefe des neueren Amyloverfahrens, p. 26.
Wojtkiewicz, A., Untersuchung der Moskauer Marktmilch, p. 53.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 15. September 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 4/7.
Ausgegeben am 14. Oktober 1913.

Zusammenfassende Übersichten.

Nachdruck verboten.

Getreidekrankheiten und Getreideschädlinge.

Eine Zusammenstellung der wichtigeren im Jahre 1912 veröffentlichten Arbeiten.

Von Dr. **E. Riehm.**

I. Nichtparasitäre Krankheiten und Schädigungen.

Auch in diesem Jahre hat Hudig (41[1]) das Wichtigste über die Dörrfleckenkrankheit des Hafers zusammengefaßt; die Angaben über das äußere Krankheitsbild, über die Ätiologie und Bekämpfung dieser Krankheit enthalten zwar nichts Neues, doch muß die Arbeit hier genannt werden, weil in ihr, meines Wissens zum erstenmal, gute farbige Abbildungen von den erkrankten Haferpflanzen veröffentlicht werden. Daß hierfür trotz der bereits veröffentlichten, ziemlich ausführlichen Beschreibung des Krankheitsbildes ein dringendes Bedürfnis vorlag, zeigt die Publikation von Krause (52), der die Vermutung ausspricht, daß die Dörrfleckenkrankheit auf Nematoden zurückgeführt werden müsse! Die von Krause untersuchte Krankheit äußerte sich nicht nur an Getreide, sondern auch an Lein, Pferdebohnen und Zuckerrüben; die Blätter der erkrankten Getreidepflanzen nahmen eine hellgrüne Färbung an und hingen schlaff an den Halmen herunter. Dann traten immer deutlicher Flecken hervor, die ineinander übergingen und sich über größere Blattpartien erstreckten. Die Flecken waren gelblich oder weißlich „unregelmäßig und ohne irgendeinen scharf abgesetzten farbigen Rand“. An den erkrankten Pflanzen wurden Rübennematoden gefunden, während die gesunden keinen Nematodenbefall aufwiesen; Krause hielt die Krankheit für identisch mit der Dörrfleckenkrankheit. Die Mitteilungen Krauses, die gelegentlich der 9. Hauptversammlung der Vereinigung für angewandte Botanik vorgetragen wurden, fanden lebhaften Widerspruch; Appel (3) machte darauf aufmerksam, daß das von Krause vorgelegte Demonstrationsmaterial nicht die Symptome der Dörrfleckenkrankheit zeige, und im ähnlichen Sinne sprachen sich auch Mortensen (65) und Westerdijk (125) aus. Krüger-Bernburg (53) glaubt, daß die Dörrfleckenkrankheit auf denselben Ursachen beruhe, wie die Herz- und Trockenfäule der Rüben. Hiltner (36) teilt mit, daß Haferpflanzen in Knopscher Nährlösung typische Dörrfleckenkrankheit zeigten, während sie in den anderen verwendeten Nährlösungen gesund blieben. Daß die Krankheit durch Nematoden hervorgerufen wird, ist gänzlich ausgeschlossen; Nematoden können „höchstens gelegentlich und dann sekundär auftreten“. Auch Störmer und Kleine (111) weisen darauf hin, daß Dörrfleckenkrankheit und Nematodenkrankheit des Hafers zwei ganz verschiedene Krankheiten sind; dies geht ja schon daraus hervor, daß es Hudig bereits 1911 gelang, in „gesunden“ Böden die Krankheit durch bestimmte Düngungen hervorzurufen[1]). Zu ähnlichen Ergebnissen ist übrigens jetzt auch Hiltner (36) gelangt. — In der Diskussion wurde von verschiedenen Seiten auch darauf hingewiesen, daß es gelingt, durch Düngung mit schwefelsaurem Ammoniak das Auftreten der Krankheit einzuschränken; Clausen (13) bestätigt in einem Aufsatz wieder, daß richtig angewandte Düngung mit Mangansulfat ein vortreffliches Vorbeugungsmittel gegen das Auftreten der Krankheit ist.

---

[1] Die Ziffern beziehen sich auf das Literaturverzeichnis am Schluß der Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich noch einen Irrtum in meinem vorjährigen Referat richtigstellen; ich hatte geschrieben, daß Nilsson-Ehle die Dörrfleckenkrankheit „anscheinend“ mit der Scolecotrichum-Krankheit verwechselt habe, hatte mich allerdings bei dieser Mitteilung nicht auf die Originalarbeit beziehen können, sondern — wie auch aus meinem Literaturverzeichnis hervorging — nur auf ein Referat. Nachdem mir die Arbeit Nilsson-Ehles vom Verf. im Original übersandt ist (70), habe ich mich davon überzeugt, daß nicht Nilsson-Ehle die beiden Krankheiten miteinander verwechselt hat, sondern daß die Dörrfleckenkrankheit in Schweden im allgemeinen häufig Scolecotrichum-Krankheit genannt worden ist.

Breazeale und Le Clerc (7) untersuchten die Entwicklung junger Weizenpflanzen in Wasserkultur. In Lösungen von Kaliumchlorid (0,15°/₀₀) entwickeln sich die Wurzeln nur schwach; besser war die Wurzelentwicklung, wenn der Kaliumchloridlösung Calciumkarbonat (0,15°/₀₀) zugesetzt wurde. „Das Kalium-Ion wird von den Wurzeln absorbiert, während das Chlorid-Ion meist in der Lösung bleibt; dadurch wird die Lösung sauer und somit ungeeignet für die Entwicklung der Wurzeln.“ Da der Säuregehalt der Lösung nur langsam zunimmt, können sich die Wurzeln bis zu einem gewissen Grade entwickeln; bringt man aber nach 10 Tagen neue Pflänzchen in die gebrauchte Lösung, so entwickeln sich deren Wurzeln bedeutend schlechter, weil sie sich nicht langsam an den höheren Säuregrad gewöhnen können. Die ungünstige Wirkung von Kaliumchlorid hatte sich auch auf Versuchsparzellen gezeigt, die 12 Jahre hintereinander mit Kaliumchlorid gedüngt worden waren; die Anreicherung des Bodens mit Säure machte eine Entwicklung der Pflanzen unmöglich. Durch Kalkdüngung konnte der Boden wieder soweit neutralisiert werden, daß normale Ernten erzielt wurden.

Die Lagerfestigkeit von Getreide bestimmte Plahn-Appiani (77) mit dem etwas modifizierten Holdefleißschen Apparat. Die Lagerfestigkeit beruht teils auf äußeren Bedingungen (Lichtgenuß, Düngung usw.), teils auf inneren, die vererbbar sind. Die von Holdefleiß befürwortete Methode, in bestimmter Höhe vom Bestockungsknoten aus ein Halmstück von bestimmter Länge zu entnehmen und dieses durch Belastung auf seine Festigkeit zu prüfen, ist nach Plahn-Appiani nicht zu empfehlen. Es ist nämlich nicht gleichgültig, ob das untersuchte Halmstück einen Knoten enthält oder nicht; auch ergaben die Untersuchungen des 2., 3. und 4. Internodiums, daß ein Halm mit einem gegen Belastung sehr widerstandsfähigen Internodium in der Festigkeit der übrigen Internodien hinter anderen Halmen sehr weit zurückstehen kann. Die Belastung muß immer an der gleichen Stelle, am besten in der Mitte eines Internodiums erfolgen; auch muß die Festigkeit mehrerer Halmglieder bestimmt werden.

---

[1]) Vgl. d. vorjährige Ref. Bd. 34 dieser Zeitschr. p. 434.

Nach Plahn-Appiani ist „die Tragfähigkeit der Getreidehalme durch Belastung der einzelnen Glieder in der (jeweils wechselnden) Länge ihrer mittleren (geometrischen) Proportionale gegeben.“

Die inneren und äußeren Ursachen der Standfestigkeit des Getreides hat Kraus (50) in einem Vortrage behandelt; er weist u. a. besonders darauf hin, daß die Standfestigkeit nicht ausschließlich aus der „mechanischen Qualität und dem mechanischen Ebenmaß“ berechnet werden kann, die unter bestimmten einzelnen Verhältnissen variabel sind, daß vielmehr die Feststellung der mechanischen Qualität unter verschiedenartigen Bedingungen erfolgen muß, auch unter solchen, die erfahrungsgemäß das Lagern begünstigen. Die Bestimmung der Tragfähigkeit hat nach Kraus nur dann Bedeutung für die Ermittelung der Standfestigkeit, wenn Biegungselastizität und Bruchfestigkeit der verglichenen Halme einander parallel laufen, was nicht immer der Fall ist. Zur Prüfung der Standfestigkeit empfiehlt Kraus Beobachtungen am Standort, eventuell Niederdrückungsversuche. Zeigt sich Lagerung, so muß nach Möglichkeit ermittelt werden, ob sie „durch Verbiegungen im oberen oder unterirdischen Teil der Halmbasis oder durch Abbiegungen am Wurzelansatz veranlaßt sind“. Durch Prüfung der reifen Pflanzen, besonders auf Biegungsfestigkeit, wird das durch Beobachtung gewonnene Bild vervollständigt.

Ziehe (133) versucht nachzuweisen, daß nur durch Kalidüngung, nicht durch Düngung mit Phosphor Lagerfestigkeit erzielt werde. Riedle (86) weist in einer Entgegnung auf die schon von Kraus ausgesprochene Ansicht hin, daß zweckmäßige Phosphordüngung sehr wohl als Vorbeugungsmittel gegen Lagern angewendet werden kann und unterzieht die den Eindruck einer Kalipropaganda machenden Ausführungen Ziehes einer berechtigten Kritik.

Bereits im Herbst des Jahres 1911 hatten Appel und Riehm darauf aufmerksam gemacht, daß die infolge der großen Trockenheit sehr wasserarmen spröden Getreidekörner beim Drusch sehr häufig verletzt worden waren und daß deshalb beim Beizen solchen Getreides größte Vorsicht am Platze sei. Leider scheint dies nicht überall berücksichtigt worden zu sein, denn von den verschiedensten Seiten wurde über schlechtes Auflaufen des Wintergetreides geklagt. So melden Hiltner und Gentner (40), daß der mit Formalin, besonders aber der mit Kupfervitriol behandelte Winterweizen schlecht aufgelaufen war, und warnen nun auch ihrerseits vor dem Beizen von Saatgut, das nicht vorher auf seine Empfindlichkeit geprüft worden ist. Auch in Württemberg hat nach Lang (56) der Weizen infolge zahlreicher Verletzungen der Fruchtschale durch das Beizen mit $CuSO_4$ gelitten; durch zahlenmäßige Feststellung konnte Lang die alte Erfahrung bestätigen, daß der mit der Maschine gedroschene Weizen zahlreichere und schwerere Verletzungen aufweist, als der mit der Hand gedroschene. — Nach Müller, Molz und Morgenthaler (66) ist die Schädigung des im Jahre 1911 geernteten Getreides durch Beizmittel auf eine „gewisse Notreife“ und auf „Störungen im Gefüge der Samenschale“ (gemeint ist wohl die Fruchtschale) zurückzuführen.

Der nasse Sommer des Jahres 1912 machte es fast überall unmöglich, das Sommergetreide rechtzeitig einzufahren, und zahlreich sind die Klagen über das Auswachsen des Getreides; unter anderen berichtet z. B. Lange (58), daß der Weizen auf dem Halm auswuchs. Von vielen Seiten wurden Vorschläge gemacht, wie man das in Garben stehende Getreide nach

Möglichkeit gegen den Regen schützen könne; so empfiehlt Gaul (24) das Aufstellen von fünf locker gebundenen Garben in Puppen über die dann eine sechste Garbe als Haube gestülpt wird. Von anderer Seite (1) wird vorgeschlagen, dort, wo das Getreide etwas lagert, auf ½ oder ⅓ Halm zu schneiden, um so die Trocknung zu erleichtern. Von Wahl (122) macht auf die Vorzüge der baltischen Korndarre aufmerksam, die es ermöglicht, auch in nassen Sommern ein trockenes Korn zu erhalten; die ausführliche Beschreibung der Korndarre muß im Original nachgelesen werden.

Nach v. Seelhorst (104) ist für die Entwicklung des Getreides Feuchtigkeit, besonders zurzeit der Bestockung, notwendig, weil zu dieser Zeit die Ähren bzw. Rispen angelegt werden. Versuche mit Hafer zeigten, daß ein guter Ertrag erzielt wird, wenn es bis etwa zum 16. Mai feucht und regnerisch ist, oder wenn die feuchte Periode spätestens am 16. Mai einsetzt. Fallen nach einem trockenen Frühjahr die ersten ergiebigen Regen erst etwa am 1. Juni, so werden weniger Ährchen angelegt und der Ertrag ist infolgedessen geringer. Große Trockenheit vom 1. Mai ab wirkt ungünstig auf die Ernte, selbst wenn vorher ziemlich viel Niederschläge zu verzeichnen sind. Die Form der Ähren wird durch die Witterungsverhältnisse beeinflußt; Trockenheit in früher Vegetationsperiode hat eine kolbige Form der Ähren zur Folge, Feuchtigkeit während der Bestockungszeit dagegen eine mehr zugespitzte Ährenform.

Lochow (61) stellte mit Roggen Versuche über den Einfluß der Aussaattiefe auf die Ernte an; lose auf den Boden gelegte Körner ergaben Pflanzen mit zu schwacher Bewurzelung, 4 cm tief ausgelegte Körner lieferten schlecht bestockte Pflanzen. Bei einer Aussaattiefe von 3 cm war das erste Blatt nicht kräftig entwickelt und der Ertrag nicht so groß, wie bei einer Aussaattiefe von 1—2 cm, welche die beste Entwicklung der Pflanzen und den größten Ertrag zur Folge hatte.

Ein Beitrag zur Frage nach dem Erfrieren der Pflanzen lieferte Maximow (63), der die Schutzwirkung verschiedener Substanzen untersuchte. Er legte bei seinen Versuchen nicht zu dünne Schnitte von Blättern des Rotkohls oder der Tradescantia discolor auf Lösungen von Kohlehydraten, Alkoholen, Acetonen und verschiedenen Salzen und ließ die Blätter dann gefrieren; hierauf wurden die Schnitte wieder aufgetaut und untersucht, ob und wieviel Zellen noch lebend waren. Tatsächlich gelang es, die Kälteresistenz der verwendeten Pflanzen zu erhöhen; diese Erscheinung ist nicht etwa durch eine Gefrierpunktserniedrigung des Zellsaftes zu erklären, da isotonische Lösungen verschiedener Stoffe, die den gleichen Gefrierpunkt besitzen, eine sehr verschiedene Schutzwirkung ausüben und da ferner die Kälteresistenz bedeutend schneller zunimmt als die Gefrierpunktserniedrigung. Von den untersuchten Stoffen übten besonders die Zuckerarten eine große Schutzwirkung aus. „Der Grad der Schutzwirkung steht in nahem Zusammenhang mit der Lage des eutektischen Punktes der Lösung; sie nimmt nach dem Erreichen dieses Punktes rasch ab. Die Stoffe, deren eutektischer Punkt sehr hoch liegt (Mannit, Na- und K-Sulfat, $Na_2C_2O_4$) zeigen gar keine Schutzwirkung.“

Molisch (64) fand, daß durch Radiumemanation das Wachstum von Getreidekeimlingen stark geschädigt wird. Die Weizenkeimlinge stellen ihr Wachstum nach der Behandlung fast ganz ein, ebenso Roggen- und Haferkeimlinge; diese schieden „an ihrer Spitze eine weiße kristallinische Masse aus“. Die Wirkung der Emanation ist nach Molisch hauptsächlich chemischer Natur, wenn auch das Anprallen der einzelnen Teilchen vielleicht auch mechanisch wirkt.

Nilsson-Ehle (71) machte Versuche über die Vererbbarkeit der Winterfestigkeit des Weizens; er fand, daß aus Kreuzungen intermediär winterfester Linien häufig transgressive, d. h. im Vergleich mit den Eltern mehr oder weniger winterfeste Abstufungen hervorgehen und zieht daraus den Schluß, daß die Winterfestigkeit eine zusammengesetzte Eigenschaft ist. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es gelingt, die beste Kombination der die Winterfestigkeit bedingenden mendelnden Eigenschaften zu erzielen; vielleicht gelingt es sogar, diese Kombination mit der Kombination anderer wertvoller Eigenschaften zu vereinigen.

In seinem Buche „Pflanzenwachstum und Kalkmangel im Boden" macht Wieler (127) auch einige Mitteilungen über Beobachtungen und Versuche mit Getreide. In der Nähe einer Hütte zeigten sich auf einzelnen Teilen eines Weizenschlages „ziemlich ausgedehnte" Stellen, auf denen die Pflanzen zwar keine Rauchbeschädigung aufwiesen, aber völlig verzwergt waren. Durch Kalkdüngung wurde normales Wachstum von Weizen und Hafer erzielt, während auf dem ungekalkten Boden wieder verzwergte Getreidepflanzen auftraten. „Damit war erwiesen, daß der Zwergwuchs auf dieser Blöße durch eine Entkalkung des Bodens bedingt war."

Bei chemischer Untersuchung einer Bodenprobe aus einem Rauchschadengebiet hatte Wieler festgestellt, daß dieser Boden viel Blei enthielt; er wurde dadurch veranlaßt, über die Wirkung metallischer Gifte im Boden auf das Pflanzenwachstum einige Topfversuche auszuführen. Durch Mennige scheint das Wachstum von Hafer etwas beeinträchtigt zu werden; „im Topf mit Zink (2 Proz. Zinkstaub) und Kalk waren die Exemplare etwas größer geworden als im Topf mit Zink allein". Am Ende der Vegetationszeit waren die Haferpflanzen in den Töpfen mit Zinkzusatz tot, ohne fruktifiziert zu haben; im Boden mit metallischem Blei waren die Pflanzen besser gediehen als in dem, der außer Blei auch einen Kalkzusatz erhalten hatte. Die Entwicklung von Weizen, und zwar besonders die Wurzelentwicklung wird nach Wielers Versuchen durch Zinkkarbonat und auch durch Zinkoxyd beeinträchtigt. Wieler kommt zu dem Schluß, „daß der Grad der Schädigung der Pflanzen durch Zink und seine Verbindungen in hohem Grade abhängig ist von der spezifischen Empfindlichkeit der Pflanze, von der Natur des Bodens und von der Natur der Zinkverbindung". Auf neutralen oder alkalischen Böden wird der Flugstaub weniger schädlich wirken als auf saueren; nun aber besteht in der Nähe von Hütten die Gefahr, daß durch die Entkalkung der Boden sauer wird oder daß saure Waldböden vom Flugstaub getroffen werden. Unter diesen Umständen wird die Vegetation durch Zink leiden; es muß bei Feststellung der Ursachen der Vegetationsschäden in solchen Gebieten auf das Zink Rücksicht genommen werden. — Endlich sei noch kurz auf eine Arbeit von Vielhaack (120) hingewiesen, der die für ein gutes Gedeihen der Pflanzen notwendige Bodenbearbeitung genau darstellt und die Fehler hervorhebt, auf die häufig eine schlechte Entwicklung der Pflanze zurückzuführen ist.

II. Pflanzliche Schädlinge.

A. Unkräuter.

Wehsarg (124) untersuchte zahlreiche Bodenproben aus verschiedenen Teilen Deutschlands auf ihren Gehalt an Unkrautsamen, indem er

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

sie sieben Jahre hindurch unter Bedingungen hielt, die für die Entwicklung etwa vorhandener Unkrautsamen günstig waren. Auch Snell (106) stellte Untersuchungen über das Vorkommen keimfähiger Unkrautsamen im Boden an und bestätigte im wesentlichen die von Peter schon vor Jahren gefundene Tatsache, daß Samen lange im Boden ruhen können, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüßen. In Waldböden, die 5 bzw. 12 Jahre alt waren, wurden von Snell noch keimfähige Samen von Ackerunkräutern gefunden. Um genaue Feststellungen über die Ruhe der Samen im Erdboden zu machen, hat Snell Töpfe mit Unkrautsamen beschickt und ½ bzw. 1 m tief eingegraben, über diese Versuche liegen bisher nur Untersuchungen aus 2 Jahren vor. Schon nach einem Jahr waren die Samen von Agrostemma githago und Dipsacus fullonum nicht mehr keimfähig; „eine Verallgemeinerung dürfte jedoch nicht angängig sein, da es sich um eine zufällige ungünstige Beschaffenheit der betreffenden Samenproben handeln könnte". (Anscheinend ist also die Keimfähigkeit der Unkrautsamen zu Beginn des Versuches nicht geprüft!) Die Tatsache, daß viele Unkrautsamen in größeren Tiefen nicht keimen, führt Snell unter anderen auf den Druck des Erdbodens zurück; bei einigen Versuchen mit Unkrautsamen, die in dünner Erdschicht z. T. einem Druck von 2 kg ausgesetzt wurden, keimten diese Samen gar nicht oder doch bedeutend weniger als die Samen, die diesem Druck nicht ausgesetzt waren. Die Versuche, welche das „Auffliegen von Unkrautsamen" beweisen sollen, hatten das nicht gerade überraschende Ergebnis, daß Unkrautsamen durch den Wind verbreitet werden. „Für die Praxis ergibt sich daraus, wie außerordentlich wichtig es ist . . . das Auffliegen neuer Samen dadurch zu verhindern, daß man Wegraine und Grabenböschungen, sowie etwa brachliegende Felder stets von Unkräutern frei hält oder wenigstens das Blühen und Fruchten derselben unterdrückt"; dies wird in der Praxis allerdings nicht immer beachtet, ist aber durch so viel Erfahrungen bewiesen, daß sich Versuche eigentlich erübrigten.

Da es nicht ganz leicht ist, in einer Bodenprobe alle vorhandenen Unkrautsamen nachzuweisen, hat Schewelew (100) eine Methode hierfür ausgearbeitet. Er mischt 4 Teile Bromoform ($CHBr_3$) mit 5 Teilen Schwefeläther, so daß das spezifische Gewicht der Mischung 1,8 beträgt; in dieser Flüssigkeit schwimmen nach kräftigem Umrühren auch kleine Unkrautsamen, selbst die von Sisymbrium thalium, von denen 100 nur 2 mg wiegen.

Gümbel (28) untersuchte die Keimungsbedingungen einiger Unkrautsamen. Die Keimung von Ackersenf wird durch Besonnung gefördert und zwar ist die für kurze Zeit gesteigerte Temperatur der besonnten Keimschalen von größter Bedeutung, wie Versuche mit Samen zeigten, die wiederholt Temperaturen von 40—50° C im Thermostaten ausgesetzt wurden. Allerdings keimen auch bei annähernd konstanter Temperatur besonnte Samen besser als verdunkelte; das wichtigste Moment bei der Keimförderung durch Besonnung ist aber nach Gümbel die Temperaturschwankung. Überschreitet die Besonnung ein nicht näher bestimmtes Optimum, so wirkt sie schädigend auf die Samen. — Die Samen von Ackersenf und Hederich konnten durch wiederholtes Umlagern im Keimbett zum Keimen angeregt werden; die die Keimung fördernde Wirkung des Umlagerns zeigte sich im Licht wie im Dunkeln. Flughafer verhielt sich gegenüber wiederholtem Umlagern der Samen völlig indifferent. Durch vorübergehendes Austrocknen des Keimmediums (Erde) konnte die Keimung der noch ruhenden Sinapis-Samen angeregt werden. — Die dem Boden oben aufliegenden Samen werden durch Frost getötet; durch das Umpflügen im Herbst werden daher die oben liegenden Unkrautsamen in günstigere Bedingungen gebracht. Trotzdem wäre es natürlich verfehlt, wenn man von dem Stoppelschälen absehen wollte, wie es von manchen Seiten empfohlen worden ist. — Selbst grüne Samen von Ackersenf, Flughafer und Hederich können nach Entfernung von der Pflanze noch völlig keimfähig werden. Endlich fand Gümbel noch, daß Ackersenfsamen unter sonst günstigen Bedingungen bei 7 cm hoher Erdbedeckung noch keimen können.

Eine Monographie des Flughafers hat Zade (131) im Auftrage der D. L. G. bearbeitet. Die Keimung von Avena fatua erfolgt im allgemeinen nach längerer Samenruhe; frisch geerntete reife Caryopsen keimen nur mit etwa 3 Proz. Die Keimung kann durch Verletzungen oder durch Einwirkung niedriger Temperaturen (—3° bis —8° C) gefördert werden. Eine Förderung der Keimung soll nach Zade auch erfolgen, wenn die Körner gerieben werden; durch das Reiben werden die Haare der Fruchtschale meist abgebrochen, selten so herausgerissen, daß mikroskopisch kleine Verletzungen der Epidermis hervorgerufen werden. Ob auf diese winzigen Verletzungen die keimungfördernde Wirkung des Reibens zurückzuführen ist, ließ sich nicht sicher entscheiden. — In der Natur keimt der im Herbst ausfallende Samen meist schon im folgenden Frühjahr, doch bleiben auch viele Samen ungekeimt mehrere Jahre im Boden liegen. Zahlreiche Versuche Zades beziehen sich auf die Wirkung der Temperatur auf die Keimung des Flughafers; da aber eine befriedigende Erklärung der eigenartigen Verhältnisse nach den mitgeteilten Versuchen kaum möglich ist, soll hier nicht näher auf die Frage eingegangen werden.

Als prophylaktische Maßnahmen gegen Flughafer wird die Verwendung reinen Saatgutes, unkrautfreier Maschinen und flughaferfreien Futters empfohlen. Zur Bekämpfung des Flughafers auf Feldern, auf denen er sich eingenistet hat, ist ein geeigneter Fruchtwechsel (Winterroggen, Grünfutter und Hackfrüchte) das einzige Mittel; der Anbau reifender Sommerfrüchte ist zu vermeiden. Danger (15) macht noch nähere Angaben über geeigneten Fruchtwechsel auf mit Wildhafer verunkrauteten Feldern. Die Unterschiede zwischen Avena sativa und A. fatua werden von Zade in Wort und Bild dargestellt; ein besonderes Kapitel ist den Zwischenformen zwischen beiden Avena-Arten gewidmet. Zade beobachtete die Nachkommenschaft solcher Zwischenformen und fand, wie er auch in einer anderen Arbeit (132) ausführt, daß die Nachkommen aufspalten, daß also die „Zwischenformen" aus Kreuzungen zwischen A. fatua und A. sativa hervorgegangen sind.

Der Windhalm (Apera spica venti) hat nach Pieper (76) ein tiefes Temperaturminimum (5° C) und keimt deshalb entweder noch im Spätherbst oder noch im ersten Frühjahr aus. Der Windhalm gehört zu den Lichtkeimern; schon eine Bedeckung mit 1 cm Erde verhindert die Keimung. Die Samen können 6 Monate (vielleicht auch noch länger) im Boden liegen, ohne ihre Keimfähigkeit zu verlieren. Apera spica venti ist ein ausgesprochenes Ackerunkraut, das besonders in Roggen und Winterweizen, seltener in Sommergetreide vorkommt. Ist ein Feld sehr stark verunkrautet, so ist dort der Anbau von Wintergetreide einige Jahre zu vermeiden; direkt läßt sich bei starker Verunkrautung der Windhalm auf Weizenfeldern durch Ausraufen verhältnismäßig leicht beseitigen, da das Unkraut den Weizen überragt. „Die äußerst kleinen Samen kommen im Getreidesaatgut gar nicht vor“, dagegen können Nachbarfelder oder Feldraine als Quelle der Verunkrautung in Frage kommen. Vor der Aussaat des Sommergetreides kann man durch gründliches Eggen die aufgelaufenen Windhalmpflänzchen vernichten; Bedingung ist aber, daß der Boden gut trocken ist.

Wiedersheim (126) hat ebenfalls in den Arbeiten der D. L. G. das Klettenlabkraut (Galium Aparine) behandelt. Galium Aparine bildet nicht so viel Samen wie viele andere „Samenunkräuter“; nach acht Zählungen kommen auf eine Pflanze nur etwa 400 Samen. Die Verbreitung der Samen durch Wasser, die von anderer Seite angenommen wurde, hält Wiedersheim für ausgeschlossen; die Samen schwimmen allerdings zuerst vermöge der zwischen den Borsten sitzenden Luftblasen, doch sinken sie schon bei leiser Berührung unter.

Eine ausführliche Monographie der Quecke verdanken wir Kraus (51). Nach einer kurzen, die verschiedenen Volksnamen und die botanische Stellung der Quecke behandelnden Einleitung bespricht Kraus die verschiedenen Verbreitungsmöglichkeiten dieses Unkrautes durch Ausläufer und Samen; wenn auch die Ausläufer eine sehr große Rolle spielen, so fruktifiziert die Quecke doch oft sehr reichlich und es liegt wohl häufig eine Ansiedelung infolge Auffliegens von Samen (bzw. Scheinfrüchten) vor, wenn die Quecke auf Neuland gefunden wird. Der Schaden, den die Quecke anrichtet, beruht in erster Linie auf einer Nährstoffentziehung, die wegen der reichen Rhizombildung bei der Quecke besonders groß ist. Außerdem spielt die Quecke eine gewisse Rolle als Wirtspflanze von Schädlingen des Getreides; so kommt bekanntlich die Queckeneule (Hadena basilinea) außer an Quecke an Roggen, Weizen und Mais vor; Heterodera radicicola bewohnt ebenfalls die Quecke und auch einige Schädlinge von Wiesengräsern (Pediculoides gramineus und Tarsonemus calmicola) parasitieren gelegentlich auf Quecke. Als Überträger des Roggenschwarzrostes (Puccinia graminis f. secalis), des Meltaues, Mutterkorns und angeblich auch von Sclerospora graminicola und Ophiobolus graminis kann die Quecke ebenfalls gewissen Schaden anrichten. Die sehr ausführlichen Angaben über Morphologie, Anatomie und chemische Zusammensetzung der Quecke müssen im Original nachgelesen werden.

Die Samen der Quecke sind unmittelbar nach der Reife keimfähig und werden in ihrer Keimung durch Licht „bedeutend gefördert“. Die Ausläufer werden meist in einer Tiefe von 10 cm gefunden und dringen nach Kraus’ Beobachtungen bis zu 15 cm tief in den Boden ein; wenn gelegentlich tiefer im Boden Rhizomstücke gefunden werden, so sind diese wohl durch die Bodenbearbeitung in größere Tiefen gebracht worden. Bei Versuchen in Glasgefäßen entwickelten Rhizome aus einer Tiefe von 20 cm noch Triebe, die die Oberfläche erreichten, aus Tiefen von 25 cm nur noch ganz vereinzelte Triebe, aus noch größeren Tiefen überhaupt keine mehr. Bei einem Topfversuch kam allerdings ein Trieb von einem 40 cm tief ausgelegten Rhizom an die Oberfläche, bei Freilandversuchen konnten aber ähnliche Beobachtungen nicht gemacht werden, im Gegenteil waren die Rhizome schon in 30 cm Tiefe nach einiger Zeit z. T. abgestorben; natürlich werden sich die Rhizome je nach der Bodenart verschieden verhalten. Gegen extreme Bodennässe verhielt sich die Quecke sehr widerstandsfähig; nur in unteren Schichten eines dauernd nassen Bodens gingen die Rhizome zugrunde. Durch

Beschattung konnte die Entwicklung der Quecke nicht völlig unterdrückt werden. Endlich stellte Kraus noch Untersuchungen über die Wirkung des ständigen Entfernens der oberirdischen Teile auf die Entwicklung der Quecke an, über ihr Verhalten gegen Trockenheit und gegen verschiedene Chemikalien.

Das beste Mittel gegen Quecke ist natürlich das, sie gar nicht erst überhand nehmen zu lassen und bei rationeller Bodenbearbeitung und angemessenem Fruchtwechsel kann sich die Quecke auch tatsächlich nicht ansiedeln. Ein Überhandnehmen der Quecke deutet meistens auf fundamentale Fehler in der Bewirtschaftung hin. Als häufigere Fehler, die eine Verqueckung der Felder zur Folge haben, nennt Kraus zu dünne Saat von Wintergetreide oder Anbau wenig winterharter Sorten, zu zeitige Frühjahrsaussaat in rauhem Klima usw. Allerdings kann auch bei guter Bewirtschaftung durch sehr ungünstige Umstände (Mäusefraß, Fritfliegenbefall,, Drahtwurmfraß) die Entwicklung der Kulturpflanzen beeinträchtigt und damit das Überhandnehmen der Quecke begünstigt werden. Ein Universalmittel zur Vertilgung der bereits eingenisteten Quecke gibt es nicht. Vielfach hat man mit wiederholtem flachen Schälen, besonders im Frühjahr, gute Erfolge erzielt, doch liegen auch viele Mitteilungen aus der Praxis vor, nach denen gerade durch tiefes Umpflügen viel erreicht wurde. Durch Hackfruchtbau und Anbau stark beschattender Gewächse (Winterroggen oder -Gerste, dichtstehender Hafer, weißer Senf und besonders Buchweizen) in Verbindung mit guter Düngung und Bodenbearbeitung wird es fast immer gelingen, die Quecke in einigen Jahren zu beseitigen.

Nach Wüst (130) ist Silene conica vor etwa 15 Jahren mit Sommerweizen in Bayern eingeschleppt worden.

Die allgemeinen Regeln für Unkrautbekämpfung hat Kerskun (44) zusammengestellt. — Eine Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit der Bekämpfung des Hederich; noch immer wird von verschiedenen, z. T. anscheinend interessierten Kreisen, als Bekämpfungsmittel Kalkstickstoff empfohlen. Daß unter noch nicht näher bekannten Umständen mit Kalkstickstoff tatsächlich „recht günstige Erfolge“ erzielt werden können, geht aus einem Aufsatz von Lang (55) hervor. Lipschütz (59) gibt an, daß durch eine morgens im Tau vorgenommene Kopfdüngung mit Kalkstickstoff der Hederich fast total vernichtet worden ist; dagegen wird von anderer Seite (54) von einem völligen Mißerfolge berichtet. Nach einem Erfolg im Jahre 1911 versagte der Kalkstickstoff im Jahre 1912 vollständig; der Hederich wuchs wie nie zuvor und der Hafer stand denkbar schlecht. Kirchhoff (45) wendet gegen diesen Versuch allerdings ein, daß der Kalkstickstoff zu früh angewendet worden sei und hebt die Vorzüge des Kalkstickstoffs hervor, der auf bergigem Gelände viel besser zu gebrauchen sei, als die „kostspielige fahrbare Hederichspritze“. Neuerdings wird auch Kainit als Unkrautbekämpfungsmittel empfohlen. Beim Morgentau gestreut soll nach Kadgien (43) Kainit zur Hederichvertilgung geeignet sein; Cieszelski (12) dagegen fand, daß nach einer Kainitdüngung der Hederich üppig gedieh. Oberbeck (73) empfiehlt die Bekämpfung des Hederich mit der Saategge und Bieler (6) stellt die wichtigsten Maßnahmen gegen die Verunkrautung durch Hederich zusammen. In Seradella ist das Spritzen mit Eisenvitriol nach Simon (105) nicht zu empfehlen, da Seradella sehr empfindlich gegen Eisenvitriol ist; im Getreide dagegen wird Hederich immer noch am sichersten mit Eisenvitriollösungen bekämpft. Die Verwendung von Eisenvitriolpulver, Chilisalpeter oder Kainit kann höchstens Erfolg haben, wenn die Proben auf die betauten Pflanzen in den Morgenstunden gestreut werden. In größeren Wirtschaften ist wegen der beschränkten Zeit in der die Bekämpfung vorgenommen werden darf, die Verwendung pulverförmiger Mittel ausgeschlossen.

Auch zur Bekämpfung von Disteln wird neuerdings von Kadgien (43) Kainit empfohlen; Remy (84) ist sogar der Ansicht, daß „Kainit bei richtiger Anwendung alle Unkrautpflanzen mit behaarten Blättern vernichtet, während Gewächse mit glatten Blättern (Erdrauch, Saudistel, Getreidearten) nicht getötet werden. Jedenfalls dürfte Kainit eine bedeutende Zukunft als Unkrautvertilgungsmittel besitzen.“ Für die Landwirtschaft wäre es natürlich äußerst günstig, wenn es gelänge, mit einem Düngemittel viele Unkräuter zu vernichten; doch glaube ich, daß die Erwartungen Remys zu weit gehen. Die Tatsache, daß man Kainit „nur vor einem trockenen Tag auf die tau- oder regenfeuchten Pflanzen auszustreuen“ hat, macht seine Verwendung auf großen Flächen sehr schwierig, wenn nicht unmöglich; auch ist es wünschenswert, daß noch mehr Versuche angestellt werden, damit man sieht, wie sich die unkrautvertilgende Wirkung des Kainit unter verschiedenen Bedingungen verhält. Nach einer Mitteilung von Schmidt (101) ist Kainit zur Bekämpfung von Disteln (leider ist nicht angegeben, welche Distel gemeint ist) ungeeignet, weil die Disteln nach kurzer Zeit wieder ausschlagen. Von Richthofen (85) empfiehlt den von seinem Inspektor erfundenen „Disteltod“, über den bereits im vorigen Jahre berichtet wurde. Das sicherste Mittel zur Vertilgung der Ackerdistel ist nicht, wie Sabarth (91) meint, das Abschneiden der Disteln, sondern das Ausziehen; auf diese, durch viele Erfahrungen gestützte Tatsache weist Baumert (5) hin.

Hat sich Huflattich auf einem Acker eingenistet, so ist nach Danger (16) das betreffende Feld zu drainieren und mit Rotklee zu bebauen, da dichtstehender Rotklee den Boden so beschattet, daß Huflattich nicht aufkommen soll; auch Johannisroggen mit Vicia villosa oder Wintergerste werden von Danger zum Anbau auf mit Huflattich verunkrauteten Feldern empfohlen.

B. Pilze.

1. Brandpilze.

Die beiden Erreger des Weizensteinbrandes, Tilletia laevis Kühn und T. tritici (Bjerk.) Winter kommen nach Sydow und Butler (119) oft zusammen in ein und derselben Ähre vor. Häufig haben aber beide Pilze ganz verschiedene Verbreitungsgebiete; so kommt nach Fuschini (22) „Tilletia Caries“ besonders in Norditalien vor, in Mittel- und Süditalien dagegen vorwiegend Tilletia laevis. Fuschini untersuchte die Wirkung verschiedener Beizmittel auf die Keimfähigkeit von drei Weizensorten; am wenigsten wurde die Keimfähigkeit durch Heißwasserbehandlung nach vorhergehendem Quellen, sowie durch Behandlung mit Lysoform oder Formaldehyd geschädigt. Beim Anbau der behandelten Weizenproben zeigte sich, daß Formaldehyd (1—2‰ 30 Minuten), Kupfervitriol (0,5 Proz.) und Lysoform (3 Proz.) zur Steinbrandbekämpfung geeignet sind. — Hiltner (31) stellte Bekämpfungsversuche mit Sublimat (0,1 Proz. 15 Minuten), „Sublimoform“ (0,1 Proz. 15 Minuten), Sublimat und Kupfervitriol (0,1 bzw. 0,5 Proz. 15 Minuten), Kupfervitriol (0,5 Proz. 15 Minuten), Formalin (0,1 Proz. eingetaucht), Floriasaatenschutz, Corbin und Cuprocorbin an. Am sichersten wirkte Sublimat in Verbindung mit Kupfervitriol; der so behandelte Weizen lieferte einen brandfreien Bestand und die höchste Körnerernte. Ein brandfreier Bestand wurde auch durch die Behandlung mit Cuprocorbin erzielt, doch war die Körnerernte gering, geringer als die der 14,9 Proz. Steinbrand aufweisenden Parzelle mit unbehandeltem Saatgut. Auch Schulze (103) beobachtete, daß die Keimfähigkeit von Weizen durch Cuprocorbin geschädigt wird, daß aber dieses Mittel den Steinbrand beseitigt. Im Gegensatz zu diesen Versuchen stehen die Mitteilungen von Müller, Molz und Morgenthaler (67), nach denen durch Cuprocorbin ebenso wie durch Antiavit, Antimycel und Corbin der Brandbefall nicht reduziert, sondern sogar erhöht werden soll! — Robert (87) empfiehlt, den steinbrandhaltigen Weizen zu waschen und dann in 0,25 Proz. Kupfervitriollösung einzutauchen. — Die Herstellung der Bordeauxbrühe wird von Scherpe (99) in einem Flugblatt ausführlich behandelt.

Bekanntlich hängt der Steinbrandbefall bis zu einem gewissen Grade von der Saatzeit ab; Munerati (68) konnte diese bekannte Tatsache durch einige Versuche bestätigen. Der am 29. September gesäte Weizen wurde weniger befallen als der im Oktober und Anfang November gesäte. Hitier (68) warnt aber davor, sich im Vertrauen auf den geringen Steinbrandbefall früh gesäten Weizens zum Unterlassen des Beizens verleiten zu lassen. — Oetken (74) wiederholt die von Praktikern mehrfach ausgesprochene Behauptung, daß der Weizensteinbrand im Boden überwintere und daß also eine Infektion nicht immer auf infiziertes Saatgut, sondern mitunter auch auf infizierten Boden zurückgeführt werden müsse. Zur Begründung führt er folgende Beobachtungen an: Auf einem Feld war der Weizen brandfrei bis auf einen Platz, an dem im Vorjahre die Dreschmaschine gestanden hatte; von hier aus war der Weizen in der Windrichtung auch noch etwas von Steinbrand befallen. Da die Versuche Honcamps und Zimmermanns vor einigen Jahren gezeigt hatten, daß unter besonderen Feuchtigkeitsverhältnissen der Steinbrand tatsächlich im Boden überwintern kann, so ist anzunehmen, daß in dem von Oetken beobachteten Fall für den Steinbrand besonders günstige Witterungsverhältnisse geherrscht haben. Eine Klärung der Frage, ob der Steinbrand in allen Bodenarten überwintern kann und welche Witterungsverhältnisse die Überwinterung begünstigen, wäre sehr erwünscht.

Wiederholt ist darauf hingewiesen, daß die Ährenform von Weizen durch Steinbrandbefall verändert werden kann; Sperling (107) bemerkt, daß bei Rauhweizen eine solche Verlängerung der Ähre infolge Steinbrandbefalls nicht eintritt.

Versuche zur Bekämpfung des Roggenstengelbrandes führte Kølpin Ravn (82) aus; er erhielt von einem Roggen mit 16 Proz. Brand 19 hkg Körner und 37 hkg Stroh pro ha; der mit heißem Wasser von 54° C (5 Min.) behandelte Roggen wies 2 Proz. Brand auf und ergab 21,5 hkg Körner und 40,6 hkg Stroh pro ha; der mit 0,1 Proz. Formaldehyd überbrauste und dann 10—12 Stunden feucht gelagerte Roggen hatte nur 1 Proz. Brand und ergab 22,1 hkg Körner und 41,3 hkg Stroh pro ha.

Der Befall durch Roggenstengelbrand ist bei zeitiger Aussaat des Winterroggens groß, bei später Aussaat gering.

Von Interesse sind die Ausführungen Raums (81) über die Züchtung

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

und den Saatbau des Fichtelgebirgshafers, doch kann an dieser Stelle nur auf das über den Haferflugbrand Gesagte eingegangen werden. Infolge der häufigen Kälteperioden im Frühjahr keimt der Fichtelgebirgshafer langsam; diese langsame Keimung zeigt sich auch in Nachbargebieten, wo günstigere Keimungsbedingungen herrschen. Da der Flugbrand diese günstigen Bedingungen ausnützt, der Hafer aber nicht, so kommt es, daß der Fichtelgebirgshafer außerhalb des Fichtelgebirges häufig einen Brandbefall aufweist, wie er im Fichtelgebirge nur selten zu verzeichnen ist. Durch eine energische Propaganda ist jetzt fast überall im Fichtelgebirge das Beizen des Saatgutes mit Formaldehyd eingeführt. Das Formalin wird von den Lagergenossenschaften an ihre Mitglieder umsonst abgegeben; bei den Feldbesichtigungen wird mit unerbittlicher Strenge jedes Feld, das auch nur einen geringen Brandbefall aufweist, aberkannt. Hierdurch und durch die in den ersten Jahren für brandfreie Bestände gezahlten Prämien ist das Beizen des Hafers in den letzten 5 Jahren im Fichtelgebirge eingeführt. — Brefeld (11) hat neuerdings wieder geäußert, daß beim Haferflugbrand eine Blüteninfektion vorkomme, ohne allerdings hierfür einen Beweis zu erbringen; auch sonst enthält der neueste Band des Brefeldschen Werkes zahlreiche Unrichtigkeiten, die z. T. darauf beruhen, daß die Arbeiten anderer Autoren ignoriert worden sind.

Hils (30) hat versucht, die Ursachen der Mycelbildung bei „Ustilago jensenii Rostr.“ festzustellen, er fand Mycelbildung besonders in Kulturen mit reichem Sauerstoffgehalt und glaubt, daß der Pilz in der Wirtspflanze durch den Sauerstoffgehalt der Interzellularen zur Mycelbildung veranlaßt wird. Ein weiteres Moment, das die Mycelbildung fördert, ist eine schwache, alkalische Reaktion des Nährbodens; da der Pilz bei Anwesenheit von Eiweißstoffen die Nährlösung alkalisch macht, bildet er auf eiweißhaltigem Substrat selbst die für die Mycelentwicklung günstige Reaktion.

Versuche über die Bekämpfung des Flugbrandes von Weizen und Gerste hat jetzt auch Schander (97, 98) ausgeführt, der in allen Punkten die von Appel und Riehm gefundenen, hier bereits besprochenen Ergebnisse bestätigte. Rostrup und Kølpin Ravn (90) berichten von guten Erfolgen einer Heißwasserbehandlung nach vorhergehender Quellung gegen Gerstenflugbrand. Wilcox (128) behauptet, daß durch die Heißwassermethode der Weizen um etwa 50 Proz. in seiner Keimfähigkeit geschädigt würde! Diese Behauptung wird schon dadurch widerlegt, daß es Landwirte gibt, die den Weizen gegen Flugbrand behandeln; welcher Landwirt würde das tun, wenn er durch die Behandlung des Weizens 50 Proz. einbüßen würde? Wilcox hat so üble Erfahrungen nur deshalb gemacht, weil er die Temperatur des heißen Wassers zu hoch (53,9° C) wählte; Weizen darf bekanntlich nur mit Wasser von 50° C, höchstens 52° C behandelt werden. Die Durchführung der Heißwasserbehandlung hat Quanjer (78) dargestellt. — Appel und Riehm (4) machten Versuche mit Saatgut verschiedener Größe, um die von anderer Seite aufgestellte Behauptung nachzuprüfen, nach der die kleinen Körner besonders viel Flugbrand enthalten; es zeigte sich, daß eine Beziehung zwischen Korngröße und Flugbrandbefall nicht besteht. — Daß durch das von Appel und Riehm angegebene Heißluftverfahren der Flugbrand vertilgt wird, geht aus einer Mitteilung von Störmer, Ruhland, Kleine und Spieckermann (116) hervor, nach der in Pommern angebaute Gerste, die in Klein-

Wanzleben und Eckendorf gegen Flugbrand behandelt worden war, keinen Flugbrandbefall aufwies.

2. Rostpilze.

Untersuchungen über die Keimungsbedingungen der Teleutosporen einiger Uredineen stellte Dietel (18) an; er untersuchte unter anderen auch Puccinia graminis. Die Sporidienbildung dieses Pilzes ist abhängig von der Temperatur; bis zu einer Temperatur von 22° C verläuft die Keimung und Sporidienbildung völlig normal, bei 23° C aber und bei noch höheren Temperaturen werden dicke, lange Keimschläuche gebildet, die an ihrem meist spiralig gewundenen Ende in einige kurze, bisweilen abfallende Zellen geteilt sind. Normale Sporidienbildung findet bei Temperaturen von 23° C ab nicht mehr statt. Die Arbeit Dietels (17) über die Abschleuderung der Sporidien bei einigen Rostpilzen bezieht sich nicht auf Getreideroste, sie soll deshalb hier nur erwähnt werden.

Wie im vorjährigen Referat des näheren ausgeführt ist, hat Pritchard gefunden, daß Puccinia graminis als Mycel in den Samen überwintert und im Frühjahr in den Keimling hineinwachsen kann. Diese Untersuchungen geben, wenn sie sich als richtig erweisen, eine plausible Erklärung für die Überwinterung des Schwarzrostes und machen die den bisherigen Erfahrungen widersprechende Mycoplasmatheorie überflüssig. Eriksson (20) erhebt nun gegen Pritchards Folgerungen eine Reihe von Einwänden; erstens stellt er der Behauptung Pritchards, daß mit Schwarzrost besetzte Weizenkörner auch in rostarmen Jahren sehr häufig sind, die Behauptung gegenüber, daß rostbefallene Weizenkörner nur sehr selten vorkommen. Man hat natürlich keine Ursache, an der einen oder der anderen Behauptung zu zweifeln und kann nur wünschen, daß recht viele Untersuchungen über das Vorkommen rostbefallener Getreidekörner angestellt werden. Der zweite Einwand Erikssons trifft die von Pritchard vertretene Anschauung nicht; Eriksson sagt: „Es hat sich auch nicht gezeigt, daß nach einem vorausgehenden schweren Weizengelbrostjahre die Weizenernte regelmäßig intensiver beschädigt wurde als nach einem Nicht-Rostjahre.“ „Nach der Aussaat der sehr rostigen Kornware vom Jahre 1890 folgte eine sehr schöne Kornware im Jahre 1891, nach dieser als Aussaat wieder eine sehr schlimme Ernte im Jahre 1892 und nach dieser wiederum eine tadelfreie Ware im Jahre 1893. Wie läßt sich dieses mit der Annahme des Kornmyceliums als direkte Quelle der neuhervortretenden Epidemie vereinigen? Man hätte erwarten müssen, daß mit dem häufigeren Vorhandensein von Rostkörnern nach einem Rostjahre die Voraussetzungen für ein folgendes Rostjahr größer sein sollten, als nach einem Nicht-Rostjahre. Die Erfahrung stützt also nicht diese Annahme sondern nötigt vielmehr zu der Auffassung, daß es — unter Voraussetzung des Vorhandenseins einer hinreichenden, innewohnenden Rostempfänglichkeit der Weizensorte — wesentlich auf die Witterungs- und Wachstumsverhältnisse im Frühjahr und im Sommer ankommt, ob das Jahr ein Rostjahr oder ein Nicht-Rostjahr wird.“ Daß das Auftreten der Getreideroste auch von der Witterung abhängt, wird niemand leugnen; diese Abhängigkeit von der Witterung erklärt vollständig, daß nach einem Rostjahr ein rostarmes Jahr folgen kann, widerspricht aber nicht Pritchards Ansicht. Auch der Flugbrand von Weizen und Gerste tritt nicht mit jedem Jahre stärker auf, weil er von der Witterung abhängig ist; trotzdem wird Weizen- und Gerstenflugbrand als Mycel im Korn verbreitet. Warum sollte dies mit dem Rost nicht ebenso möglich

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

sein? Ein anderer Einwand Erikssons gegen Pritchard scheint zunächst Beachtung zu verdienen. Eriksson weist darauf hin, daß dem Rostausbruch eine lange rostfreie Periode vorausgeht, und daß es ihm nicht möglich war, jemals die geringste Spur von Mycel in Getreidepflanzen zu finden, auch in solchen Jahren nicht, in denen später viel Rost auftrat. Diesen negativen Befunden Erikssons stehen allerdings die positiven Ergebnisse Pritchards gegenüber, der Mycelien mit zweikernigen Zellen im Gewebe der jungen Getreidepflanzen gefunden hat. Eriksson zweifelt wohl nicht daran, daß Pritchard Rostmycel vor sich gehabt hat, denn er sagt: „Ein Rostmycelium kann im Getreidekorn vorhanden sein. Wenn das Leben in den Geweben des Kornes geweckt wird, so erwacht auch das Leben in dem darin wohnenden Mycelium, und dieses wächst aus und verbreitet sich, wo überhaupt Nahrungssubstrat zugänglich ist, — in Stamm-, Blatt- und Wurzelgeweben, im sterilen, vegetativen Stadium. Daraus folgt aber nicht, daß ein solches Mycelium bei der Überwinterung der Pilzart eine Rolle spielt.“ Allerdings folgt es nicht mit zwingender Notwendigkeit; aber wenn man mit Eriksson zugibt, daß Pritchard in Pflanzen aus rostbefallenen Körnern Rostmycel gefunden hat, warum soll dann dies Mycel im „sterilen vegetativen Stadium“ bleiben? Man sieht, daß durch Erikssons Einwände Pritchards Ansicht nicht widerlegt wird; allerdings bleibt es, wie ich schon im vorigen Jahre hervorhob, wünschenswert, daß Pritchards Untersuchungen einer Nachprüfung unterzogen werden.

Zur Bekämpfung gegen den „Blattrost“ des Weizens will Prühs (79) mit Erfolg Gips verwendet haben; der Gips (150—200 kg pro Morgen) wurde morgens auf das mit Tau bedeckte Getreide gestreut. Der Rost verschwand; der Körnerertrag betrug auf dem gegipsten Felde 17,25 Zentner gegenüber 11 Zentner auf dem ungegipsten. Pettera (75) gibt an, daß nach dem Aufstreuen von Superphosphat auf gelagertes Getreide auf diesem Getreide kein Rost aufgetreten sei, während das übrige Getreide Rostbefall aufwies.

An dieser Stelle muß noch auf eine interessante Arbeit von Nilsson-Ehle (71) hingewiesen werden, die bereits 1911 erschien. Nilsson-Ehle stellte Untersuchungen über die Resistenz von Weizen gegen Gelbrost an. Eine absolute Immunität einer Weizensorte gegen Gelbrost wird es kaum geben; „eine Sorte, die in einem mittelmäßig starken oder sogar ziemlich starken Rostjahr noch ganz unbefallen, „immun“ ist, kann in einem sehr starken Rostjahre ob auch zwar nur verhältnismäßig wenig, befallen werden.“ Auch die äußeren Bedingungen können die Resistenz einer Weizensorte gegen Gelbrost verändern; so können bei Svalöf auch in starken Rostjahren fast immune Sorten unter anderen klimatischen Verhältnissen sehr anfällig sein. Nilsson-Ehle hält es deshalb für zweckmäßig, nicht von immunen, sondern von „am meisten resistenten“ Sorten zu sprechen. Bei Kreuzungsversuchen konnte beobachtet werden, daß die Rostresistenz aufspaltet; es zeigte sich, daß „die spezifische Resistenz gegen Gelbrost eine der betreffenden Linie ganz charakteristische Eigenschaft ist, die sie auf einem gegebenen Platz Jahr nach Jahr treu behält, ohne daß eine Veränderung derselben — abgesehen von den schon beschriebenen kleinen Schwankungen im relativen Verhältnisse, die die Sorten in verschiedenen Jahren zeigen — konstatiert werden kann.“ Die Rostresistenz beruht nach Nilsson-Ehle auf einer Verbindung mehrerer für sich mendelnder Faktoren.

Über die verschiedene Widerstandsfähigkeit der Formen des Sommergetreides gegen Rost stellte Litwinow (60) Beobachtungen an. Berücksichtigt man „den Infektionsgrad der Ähren und den Gang der Infektion durch Puccinia triticina im Zusammenhang mit dem Gang der Entwicklung der Pflanzen selbst, insbesondere die Zeit der Ährenausbildung, so lassen sich Unterschiede im Grade und der Art und Weise der Infektion nicht nur bei den einzelnen Varietäten, sondern auch bei den einzelnen reinen Linien ein und derselben Varietät feststellen.“ Triticum compactum wurde im höheren Grade infiziert als Triticum vulgare; „wie bei den gemeinen Weizenformen, so erwies sich auch hier bei der grannenlosen Form (Varietät Creticum) die Ähre schwach vom Rost infiziert, bei der Mehrzahl der begrannten hingegen waren die Ähren stark von Puccinia triticina infiziert.“ Sehr widerstandsfähig gegen Puccinia triticina war Triticum durum, von dem 48 reine Linien untersucht wurden; auf den Blättern des Hartweizens waren zwar gelbe Flecke, aber nur wenig Uredolager. — Durch Kreuzung einer sehr rostanfälligen, italienischen Weizensorte „Riéti“ mit Japhetweizen erhielt Génin (25) einen widerstandsfähigen Weizen.

3. Fusarien.

Über Fusarien, speziell über die als Schneeschimmel auftretenden Pilze der Gattung Fusarium liegen im Jahre 1912 einige Arbeiten von Schaffnit (92—96) vor, die zum Teil die Untersuchungen früherer Autoren bestätigen, zum Teil ergänzen. Unter Schneeschimmel verstand man gewöhnlich Fusarium nivale Sor. und F. hibernans Lindau; diese beiden Pilze sind miteinander identisch. Als Autor ist Cesati zu Fusarium nivale zu setzen; mit dem F. nivale Ces. ist auch F. minimum Fuckel identisch, während F. oxysporum Schlecht. eine Mischart darstellt. Schaffnit hat den von ihm als Fusarium nivale Ces. bezeichneten Pilz von Getreidepflanzen isoliert in Kultur genommen, und seine morphologischen und physiologischen Eigenschaften eingehend studiert. Die Konidien des Pilzes stehen entweder einzeln oder sie bilden falsche Köpfchen, Ballen, Sporodochien oder Pionnotes (nicht Pinnotes). Die Sporodochien treten meist in Reihen über den Spaltöffnungen auf. Die Form der Konidien ist, wie bei allen Fusarien äußerst variabel; der „normale Typus“ der Konidien ist schwach gekrümmt mit geringer Querschnittsänderung im mittleren Teil und stärkerer Verjüngung am Scheitelseptum. Der Fuß ist nicht stiefelförmig, sondern weist höchstens eine zapfen- oder sackartige kurze Papille auf; die vorherrschende Septenzahl ist 3, doch wurden auch Konidien mit 1, 2, 4 und sogar 5 und 6 Septen beobachtet. Zweizellige Sporen sind bisweilen nicht keimfähig; man hat sie als unentwickelte Formen oder Hungerformen zu betrachten. Schaffnit erhielt in seinen Kulturen auch Schlauchfrüchte, die er als Nectria graminicola bestimmte. Das Bildungsgewebe der Perithecien „ist anfangs rosa, verfärbt sich dann rotbraun und nimmt in der Folge einen olivbraunen Farbenton an; die reifen Perithecien erscheinen schließlich völlig schwarz“. Aus dieser Beschreibung scheint mit Sicherheit hervorzugehen, daß der Pilz keine Nectria ist. Schaffnit hat auch inzwischen seinen Irrtum erkannt und in einer soeben erschienenen Veröffentlichung, die erst im nächstjährigen Referat behandelt werden kann, die Perithecienform als Calonectria beschrieben. Auch dieses scheint mir nicht richtig zu sein, denn nach der allerdings anfechtbaren, aber bis heute noch geltenden Einteilung der Ascomyceten gehören zu den

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Hypocrealen nur Pilze mit nicht schwarzen Perithecien. Wenn man also die bisher geltenden Einteilungsprinzipien aufrecht erhalten will, so muß man zu dem Schluß kommen, daß Schaffnits „Nectria“ bzw. „Calonectria“ überhaupt keine Hypocreale, sondern eine Sphaeriale ist.

Daß zu Fusarium nivale eine Ascusform gehört, hat bereits Ihssen sehr wahrscheinlich gemacht, der an Pflanzen, die mit Reinkulturen von Fusarium nivale geimpft und gegen eine Fremdinfektion möglichst geschützt waren, Perithecien fand. Ihssen hatte auf Grund von Lindaus Bestimmung den Pilz für eine Nectria graminicola erklärt, doch scheint es nach Ihssens Angaben über die Farbe der Perithecien, als ob auch dieser Pilz nicht zu den Hypocrealen gerechnet werden könne; vielleicht sind der Ihssensche und der Schaffnitsche Pilz identisch. — Schaffnit kultivierte sein „Fusarium nivale Ces.“ und einige andere Fusarien bei verschiedenen Temperaturen und bestätigte Sorauers Befund, daß der Schneeschimmel kein besonders tiefes Temperaturoptimum besitzt. Das schnelle Verschwinden des Mycels nach dem Schmelzen des Schnees wird bereits von Sorauer auf Besonnung und Luftzug zurückgeführt; auch Schaffnit fand, daß das Mycel von Fusarium nivale gegen Austrocknung äußerst empfindlich ist, daß aber bei genügender Feuchtigkeit, Sonnenschein und Luftzug das Mycel nicht schädigen.

Da das Getreide zu der Zeit, in der Schneeschimmel aufzutreten pflegt, durch den Lichtentzug unter der Schneedecke mehr oder weniger etioliert ist, benutzte Schaffnit für seine Infektionsversuche Pflanzen, die unter blauen Glocken herangezogen waren. Außer Fusarium nivale erwies sich auch F. subulatum als parasitär und auch F. rubiginosum und F. metachroum konnten die etiolierten Pflanzen zerstören. Normale (nicht etiolierte) Getreidepflanzen wurden nur durch Fusarium nivale stark angegriffen.

Fusarium nivale kann, wie Schaffnit durch Infektionsversuche zeigte, auch Fußkrankheiten hervorrufen, wenn am Halmgrunde kleine Verletzungen vorhanden sind. Man wird kaum fehl gehen, wenn man annimmt, daß fußkranke Pflanzen einen geringeren Körnerertrag ergeben, als gesunde Pflanzen; Schaffnit suchte dies experimentell zu beweisen, indem er „sämtliche Halme an der Basis kurz nach der Blüte (13. Juni) mit einem Messer verletzte, so daß die Verwundung etwa der durch Fusarium nivale hervorgerufenen Gewebezerstörung entsprach“. Durch diese Versuche kann natürlich nur gezeigt werden, daß mechanische Verletzungen der Halme den Körnerertrag herabsetzen können; der „Einfluß der Fußkrankheiten auf den Ertrag“ kann durch derartige Versuche nicht bewiesen werden.

Die Infektion des Kornes erfolgt entweder vor der Gelbreife (Primärinfektion) oder nach derselben (Sekundärinfektion). Bei der Primärinfektion wird die Koleoptilenanlage durch den Pilz geschädigt, so daß die Keimung nicht normal verläuft; dies tritt besonders zutage, wenn statt der üblichen Keimbetten (Papier, Sand) das von Hiltner vorgeschlagene Ziegelmehl verwendet wird. Da im Boden die Keimung häufig durch Verkrustung oder andere Faktoren erschwert ist, so hält es Schaffnit, ebenso wie Hiltner, für zweckmäßig, bei der Samenkontrolle neben der Keimfähigkeit im gewöhnlichen Keimbett auch die „Triebkraft“, d. h. die Keimfähigkeit in Ziegelgries festzustellen. Bei später (Sekundär-) Infektion wird die Keimlingsanlage kaum beeinträchtigt; der Pilz dringt dann nur zwischen die „Testaschichten“.

Da das Auftreten des Schneeschimmels sehr von den Witterungs- und Bodenverhältnissen abhängt, hält es Schaffnit für eine unberechtigte Forderung, wenn etwa das Beizen des von Fusarium befallenen Saatgutes durch die Anerkennungskommissionen obligatorisch gemacht würde. Im Gegensatz hierzu steht Hiltner (35); wenn anerkanntes Saatgut einen hohen Fusariumbefall aufweist, so erfolgte nach seiner Ansicht die Anerkennung zu unrecht. In Bayern wird schon jetzt das zur Untersuchung eingesandte Saatgut auf Fusarium geprüft. Ob die Forderung Hiltners berechtigt ist, läßt sich nur entscheiden, wenn man darüber im klaren ist, was die Saatenanerkennung bezwecken soll. Soll der Landwirt beim Kauf anerkannten Saatgutes die Gewähr haben, ein in jeder Richtung einwandfreies Saatgut zu beziehen, so muß natürlich das Korn frei von Fusarium sein, dann muß es aber auch frei von allen anderen mit dem Saatgut übertragbaren Krankheitserregern sein. Soll aber durch die Anerkennung eines Saatgutes nur ausgesprochen werden, daß das Korn von einem Feld stammt, das einen guten Bestand gleichmäßiger Ähren aufweist, so erübrigt sich eine Untersuchung auf Fusarium. Bei der Saatenanerkennung wird bisher wenig konsequent verfahren; Felder mit etwas Steinbrand werden aberkannt und auch ein gewisser Prozentgehalt an Flugbrand genügt für die Aberkennung des Feldes. Treten dagegen Helminthosporium oder Fußkrankheit auf, die ebenso wie Brand bei der Feldbesichtigung zu erkennen sind, so wird das Saatgut oft ohne Bedenken anerkannt. Die Inkonsequenz ist wohl in erster Linie darauf zurückzuführen, daß den die Besichtigung ausführenden Landwirten vielfach noch die notwendigen phytopathologischen Kenntnisse fehlen. Es wäre wünschenswert, daß zu der Saatenanerkennung neben den Landwirten auch Phytopathologen hinzugezogen würden, damit die anerkannten Saaten wirklich einwandfrei sind; dem Landwirt nützt die Anerkennung viel mehr, wenn sie ihm ein in jeder Hinsicht tadelloses Saatgut garantiert.

Zur Bekämpfung des Fusarium nivale ist es notwendig, Fusarium-freies Getreide zu verwenden oder durch geeignete Saatgutbeizen den Pilz abzutöten. Allerdings ist das Abtöten der Pilze zwecklos, wenn die Körner schon vor der Gelbreife infiziert sind, weil die nicht normal entwickelte Coleoptylenanlage durch die Beizung nicht verändert werden kann; da aber primär infizierte Körner leichter als normale Körner sind, lassen sie sich bei der sachgemäßen Vorbereitung des Saatgutes mit Windfege, Trieur usw. entfernen. Anders verhält es sich mit den sekundär infizierten Körnern; diese lassen sich durch Saatgutbehandlung von Fusarium befreien. Schaffnit hält es mit Recht für bedenklich, das giftige Sublimat an Jedermann abzugeben; es gelang ihm, in dem schwefelsauren Dioxychinolin (Chinosol) ein Mittel zu finden, das zur Fusariumbekämpfung ebenso geeignet ist wie Sublimat und das dessen giftige Eigenschaften nicht besitzt. Durch viertelstündige Einwirkung einer 0,1-proz. Chinosollösung konnte das Fusarium abgetötet werden, auch Kupfersulfat (1 Proz. 15 Minuten) oder Formalin (0,2 Proz. 15 Minuten) eignen sich nach Schaffnit gut zur Bekämpfung der Fusarien. Hiltner (33—35) steht allerdings immer noch auf dem Standpunkt, daß das beste Beizmittel Sublimat sei und verwirft (38) besonders das Chinosol als völlig „ungeeignet“, zumal mit diesem noch keine Feldversuche gemacht worden seien. Ob dies berechtigt ist, läßt sich ohne eine Nachprüfung nicht beurteilen; nicht berechtigt ist es aber, wenn man nur das Sublimat als Bekämpfungsmittel gegen Fusarium empfiehlt. Mortensen (65) hat mit Kupfersulfat ebenso gute Erfolge gehabt wie mit Sublimat und macht darauf aufmerksam, daß Rostrup bereits 1893 eine Behandlung des vorher gequellten Saatgutes mit heißem Wasser empfohlen hat. Nach Appel (2) ist eine Behandlung mit heißem Wasser nach 2-stündigem Quellen als geeignetes Bekämpfungsmittel zu betrachten[1]). Wenn so viel verschiedene Mittel (Heißwasser, Formalin, Kupfersulfat und Chinosol) zur Bekämpfung des Fusarium geeignet sind, erübrigt sich die Verwendung des giftigen Sublimates. Hiltner hält allerdings die Sublimatbeize für besonders wirksam; er sagt, „daß namentlich der Sublimatbeize des Roggens eine geradezu nationale Bedeutung zukomme".

Das Beizen gegen Fusarium kann nach Schaffnit (94) aber nur dann von Wert sein, wenn der Boden frei von Fusarium ist; die Infektion der Keimlinge vom Boden aus besitzt nämlich nach Schaffnit „größere oder doch mindestens die gleiche Bedeutung" wie die vom Saatgut ausgehende Infektion der jungen Pflanzen. Daß Fusarien im Boden vorkommen, konnten außer Schaffnit auch Dale (14) und Jensen (42) zeigen, die beide die Pilzfloren einiger Böden untersuchten. Die Fusarien können auch im Boden überwintern, denn die Konidien werden, wie Schaffnits Versuche zeigen, auch durch eine Temperatur von —25° C noch nicht abgetötet. Auch die Konidien anderer Pilze erwiesen sich gegenüber niedrigen Temperaturen als widerstandsfähig, so die Konidien von Erysiphe graminis, Cladosporium herbarum u. a. m.; Schaffnit bestätigt damit die von Ewert gefundene Tatsache, daß nicht nur die früher als Winterfruchtformen bezeichneten Perithecien und Pykniden, sondern auch gewöhnliche Konidien gegenüber tiefen Temperaturen resistent sind.

Eine direkte Bekämpfung der im Boden lebenden Fusarien ist noch nicht möglich, doch empfiehlt Schaffnit einige Maßnahmen, die einer übermäßigen Ausbreitung des Schneeschimmels vorbeugen sollen. Die Aussaat der Winterung darf nicht zu früh erfolgen, damit sich das Getreide nicht zu üppig entwickelt; ist die Entwicklung durch Witterungsverhältnisse begünstigt, sehr weit vorgeschritten, so empfiehlt es sich, das Getreide vor dem Winter zu schröpfen. Durch Zerstörung der Schneedecke mittels Egge und Scheibenegge kann für Durchlüftung gesorgt werden, so daß die Entwicklungsbedingungen für den Schneeschimmel nicht günstig sind. Ist die Temperatur um 0° herum, so kann man den Schnee durch Aufstreuen von Düngesalzen (Chili- oder Kalksalpeter) zum Schmelzen bringen; vor Anwendung dieses Mittels ist aber zu warnen, wenn der Boden noch zu fest gefroren ist, weil dann die Pflanzen durch die in den Boden nicht eindringenden Salzlösungen geschädigt werden.

Hiltner und Gentner (39) geben an, daß die Sublimatbeize des Roggens nicht nur die am bzw. im Korn befindlichen Fusarien abtötet, sondern auch die Keimlinge gegen Angriffe durch im Boden lebende Fusarien schützt. Zu diesem etwas überraschenden Ergebnis kommen die Autoren

---

[1]) Wollenwebers (129) Ausspruch „Die Warmwassermethode gibt bei vorheriger Vorquellung der Saat eine mittlere Proportionale bei den Methoden der Entpilzung", ist absolut unverständlich.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

auf Grund folgenden Versuches: In einen mit Fusarien angereicherten Boden wurde ein Fusarium-freier Roggen ungebeizt bzw. mit Sublimat gebeizt, eingesät; der gebeizte Roggen entwickelte sich besser und gab einen höheren Ertrag als der ungebeizte. Ob die aus ungebeiztem Roggen gewachsenen Pflanzen auf Fusariumbefall untersucht worden sind, ist nicht angegeben, auch wurde nicht etwa zur Kontrolle gebeizter Roggen in sterilisiertem Boden ausgelegt; aus dem Versuchsergebnis läßt sich also mit der gleichen Sicherheit der Schluß ziehen, daß durch Sublimatbehandlung von Roggenkörnern auf die Keimlinge ein Reiz ausgeübt werde, der eine üppige Entwicklung und höheren Ertrag zur Folge hat.

4. Fußkrankheiten.

Im Frühjahr des Jahres 1912 beobachtete Hiltner (32) an Getreide, das in Ziegelmehl gekeimt hatte, Mycel, das er für Ophiobolus- oder Leptosphaeriamycel hielt. Er machte in einem Aufsatz darauf aufmerksam, daß Fußkrankheiten im Sommer häufig auftreten würden und behielt mit seiner Prophezeiung auch recht. Nicht nur aus Bayern, sondern auch aus Pommern (124) und Hessen-Nassau (8) wurde über häufiges Auftreten von Fußkrankheiten berichtet. Nach Hiltner ist für das Auftreten der Fußkrankheiten die Witterung des Vorjahres ausschlaggebend; Fußkrankheiten werden mit dem Saatgut verbreitet und treten immer nach trockenen Jahren auf. Wenn auch dieser Ansicht Hiltners eine gewisse Berechtigung nicht abgesprochen werden kann, so ist sie doch nicht allgemein giltig. Grosser (27) macht darauf aufmerksam, daß in Schlesien 1904 große Dürre herrschte, daß aber trotzdem im folgenden Jahre keine Fußkrankheiten auftraten; andererseits zeigten sich im Jahre 1900 häufig Fußkrankheiten, obwohl im Jahre zuvor das Getreide nicht notreif geerntet wurde. Sicher hat Grosser recht, wenn er darauf hinweist, daß das Auftreten von Fußkrankheiten nicht allein auf die Witterungsverhältnisse des Vorjahres zurückgeführt werden muß, daß vielmehr auch die Witterung des betreffenden Jahres selbst (Frost) oder andere ungünstige Verhältnisse (einseitige Überernährung oder Verunkrautung) dem Auftreten der Fußkrankheiten Vorschub leisten können. Störmer und Kleine (124) fanden an den fußkranken Pflanzen außer Ophiobolus bzw. Leptosphaeria auch häufig Fusarien, deren Auftreten als Fußkrankheitserreger durch Fröste oder Dürre begünstigt werden soll. Schaffnit (94) fand bei seinen Infektionsversuchen, daß nur solche Getreidepflanzen von Fusarien infiziert werden können, die unten am Halm Verletzungen aufweisen. Als sicherstes Mittel, einer Verbreitung der Fusarien vorzubeugen, empfehlen Störmer und Kleine, unmittelbar nach der Ernte die Stoppeln zu schälen, weil an diesen die Fusarien massenhaft fruktifizieren; vor dem Schälen der Stoppeln kann man auf sandigen Lehm- oder lehmigen Sandböden 10 Zentner Kalkmergel streuen. Will man das Erntegut im nächsten Jahre wieder zur Saat verwenden, so muß man es vorher im Sandkeimbett 4 cm tief auslegen, um es auf Fusariumbefall zu prüfen; einen Befall bis zu 5 Proz. halten Störmer und Kleine für unbedenklich.

Voges (121) kam auf Grund einiger Infektionsversuche zu der Überzeugung, daß Pilze als „primäre“ Ursache der Fußkrankheiten ausscheiden, eine Ansicht, die schon wiederholt ausgesprochen ist. Interessant sind aber die Ergebnisse der von Voges angestellten Reinkulturversuche mit Ophiobolus; er fand in den Kulturen zweierlei Mycel, ein dick- und ein dünnwandiges. Zwischen beiden Mycelformen konnten Übergänge beobachtet werden; an dem dünnwandigen Mycel wurden Fusariumsporen gebildet. Wenn auch aus diesem Fusarium noch nicht Perithecien gezüchtet wurden, so ist doch, die Richtigkeit der Beobachtung vorausgesetzt, der Zusammenhang zwischen Ophiobolus und einem Fusarium erwiesen.

5. Andere pilzparasitäre Krankheiten.

Über den Alkaloidgehalt des Mutterkornes auf englischem Raygras (Lolium perenne) stellte Bredemann (9) Untersuchungen an; die Sklerotien sind auf dieser Wirtspflanze kleiner, weisen aber einen bedeutend höheren Alkaloidgehalt auf als die auf Roggen. Staeger (109) fand an Claviceps-Sklerotien, die etwa 10 Monate im Zimmer aufbewahrt worden waren, in den fast ganz eingetrockneten „Mützchen" noch keimfähige Konidien von Claviceps. Die Keimung dieser Konidien verlief normal, ja es gelang auch Infektionsversuche mit ihnen auszuführen.

Zur Bekämpfung der Streifenkrankheit der Gerste empfiehlt Störmer (110), das Saatgut 16 Stunden lang in ½-proz. Kupfervitriollösung einzutauchen; durch eine Behandlung mit Wasser von 56° C wurde der Pilz nicht abgetötet.

Starkes Auftreten von Meltau soll man nach Störmer und Kleine (112) durch eine Düngung mit Phosphorsäure und Kali verhindern können.

Endlich sei noch kurz erwähnt, daß nach Kocziez (46) das Pilzbekämpfungsmittel „Forbin" 40,8 Proz. $CuSO_4$ enthält.

C. Tierische Schädlinge.

Durch Getreideblasenfüße wird die Getreideernte unter Umständen nicht unerheblich vermindert. Straňák (117) fand, daß die befallenen Ähren sehr lückig sind; in einzelnen Fällen fehlten 29 Proz. der Ährchen. Auf Roggen trifft man am häufigsten Anthothrips aculeatus, auf Weizen Stenothrips graminum, auf Gerste Limothrips denticornis. Durch einen zweckmäßigen Fruchtwechsel soll man nach Straňák dem Überhandnehmen der Blasenfßüe entgegen wirken können; spät gesätes Wintergetreide soll weniger befallen werden als früh gesätes.

Von verschiedenen Seiten [Bredemann (10), Rostrup und Kølpin Ravn (90), Schoyen (102) u. a.] wird auf das massenhafte Auftreten der Blattläuse an Getreide im Jahre 1911 hingewiesen; eine Bekämpfung dieser Schädlinge ist besonders auf großen Feldflächen natürlich unmöglich.

Das recht häufige Auftreten der Fritfliege im Jahre 1912 veranlaßte Lomberg (62) das Wichtigste über Entwicklung und Bekämpfung dieses Schädlings nochmals zusammenfassend darzustellen. Gaul (23) machte die Beobachtung, daß die Fritfliege im Frühjahr 1912 besonders im Hafer sehr stark auftrat; ein Unterschied im Befall der einzelnen Sorten konnte nicht bemerkt werden. Auf reich gedüngten Feldern kamen die Nebentriebe der befallenen Pflanzen besser zur Entwicklung als auf weniger gedüngten Feldern; durch gute Düngung kann nach Gaul trotz Fritfliegenbefalls doch noch ein leidlicher Ertrag erzielt werden.

Rostrup und Kølpin Ravn (90) machten wieder die Beobachtung, daß früh (12. April) gesäte Gerste wenig von der gelben Halmfliege (Chlorops taeniopus) befallen wird, während spät (8. Mai) gesäte sehr unter diesem Schädling zu leiden hat. Straňák (118) hat nochmals einen Apparat zur mechanischen Bestimmung des Widerstandes von Getreidesorten gegen Pflanzenkrankheiten beschrieben; daß die Bestimmungen mit diesem Apparat ziemlich roh ausfallen müssen, ist im Vorjahre bereits gesagt.

Als Vorbeugungsmittel gegen die Hessenfliege wird im allgemeinen späte Aussaat des Wintergetreides empfohlen und zwar soll das Getreide zu einer Zeit gesät werden, wo die Herbstgeneration der Hessenfliege nicht mehr umherfliegt. Hopkins hatte über diesen Zeitpunkt Beobachtungen angestellt und gefunden, daß das Verschwinden der Hessenfliege naturgemäß von der Höhenlage des betreffenden Ortes abhängt und zwar soll ein Höhenunterschied von 100 Fuß ungefähr einen Tag ausmachen; liegt also ein Ort 100 Fuß höher als ein anderer, so verschwindet die Hessenfliege dort einen Tag früher als an dem niedriger gelegenen Ort. Nach Websters Beobachtungen macht die geographische Breite ihren Einfluß auf das Verschwinden der Hessenfliege in der Weise geltend, daß $1/4^0$ nördlicher die Hessenfliege um einen Tag früher verschwindet. Headlee (29) hat das Hopkin-Webstersche „Gesetz“ in Kansas 4 Jahre hindurch geprüft und gefunden, daß es richtig ist; er konnte nach dem Verschwinden der Hessenfliege an einem bestimmten Ort im voraus berechnen, wann die Hessenfliege an anderen Punkten verschwinden würde. In einigen Gegenden stimmten allerdings die voraus berechneten Daten nicht mit den Tagen überein, an denen die letzten Hessenfliegen beobachtet wurden; dies ist nach Headlees Ansicht darauf zurückzuführen, daß auch die Feuchtigkeitsverhältnisse, die in dem Hopkin-Websterschen Gesetz nicht berücksichtigt sind, von Bedeutung für das Verschwinden der Hessenfliege sind.

Die Berechnung des Auftretens bzw. Verschwindens eines Schädlings wäre natürlich von größter Bedeutung, wenn sie wenigstens annähernd mit den tatsächlichen Verhältnissen übereinstimmen würde. Vorläufig muß man den mathematischen Berechnungen des Verschwindens der Hessenfliege wohl noch ebenso skeptisch gegenüber stehen, wie den Berechnungen des Auftretens der Plasmopara, wie sie Savoly ausführt. Daß das Auftreten bzw. Verschwinden von Schädlingen sehr von den Witterungsverhältnissen abhängt, ist sicher; ebenso sicher ist aber, daß die Meteorologen die Witterung für mehrere Tage oder gar Wochen noch nicht mit mathematischen Formeln bestimmen können.

An den Wurzeln von Mais wird, besonders auf Feldern, die jedes Jahr Mais tragen, die Larve von Diabrotica virgifera gefunden; nach Gillette (26) ist Diabrotica filicornis wahrscheinlich das Männchen zu D. virgifera. — Webster (123) zählt die natürlichen Feinde von Meliana albilinea auf. — Störmer und Kleine (113) behandeln in einem Aufsatz die wichtigsten Mittel gegen den Drahtwurm: Walzen des Bodens, Kopfdüngung mit Kainit und in letzter Linie auch das Auslegen von Kartoffelstücken.

Die Entwicklung des blauen Getreidehähnchens wird von Fulmek (21) dargestellt. Tritt dieser Schädling auf Grünfutter auf, so muß man dieses vor der Verfütterung trocknen, da das Vieh mit Lemalarven reich besetztes Futter nur ungern nimmt. — Eine Zusammenstellung der wichtigsten Bekämpfungsmittel gegen schädliche Insekten hat Rostrup (89) veröffentlicht.

Zur Verminderung der Sperlingsgefahr empfiehlt Rörig (88) das Aufhängen künstlicher Sperlingsnester aus gebranntem Ton; in einem Sommer wurden auf einem Gut in 21 solchen Nestern 165 junge Sperlinge und 84 Eier gesammelt. In Gegenden, wo Sperlinge lästig werden, verspricht dieses einfache Mittel Erfolg, wenn es von ganzen Gemeinden ausgeführt wird; die Tonnester sind möglichst unter vorspringenden Dächern aufzuhängen.

Eine Reihe von Publikationen behandelt Versuche mit Saatenschutzmitteln gegen Krähen; da verschiedene Präparate gleichzeitig auch gegen Steinbrand wirksam sein sollen, sind einige der in Betracht kommenden Arbeiten bereits oben erwähnt. Was zunächst die Wirkung der Mittel auf die Keimfähigkeit des Getreides anbelangt, so wird nach Müller, Molz und Morgenthaler (67) der Aufgang der Saaten durch Corbin und Cuprocorbin beeinträchtigt; nach Schulze (103) wird die Keimfähigkeit durch Cuprocorbin herabgesetzt, der Aufgang auf dem Feld durch Corbin und Cuprocorbin um 3—4 Tage verzögert. Neger (69), der Samen von Fichten mit Corbin behandelte, warnt entschieden vor dem Gebrauch dieses Mittels. — Ein wirksamer Schutz der Saaten gegen Vögel wird nach dem fast übereinstimmenden Urteil der Autoren weder durch Corbin oder Cuprocorbin, noch durch Antiavit erreicht. Nur Cuprocorbin soll die Saaten nach Müller, Molz und Morgenthaler (67) einigermaßen gegen Sperlinge und Lerchen schützen; neben die Versuchsparzellen gestreute, mit Cuprocorbin gefärbte Körner wurden aber ebenso gefressen wie die mit Antiavit behandelten. Nach Schulze (103) werden gefärbte Samen selten aus dem Boden herausgeholt, doch zerstörten die Vögel dann die aufgelaufene Saat. Die von Neger (69) mit Corbin gefärbten Fichtensamen wurden ebenso gefressen wie die daneben gestreuten unbehandelten; Raebiger (80) endlich fand, daß mit Antiavit gefärbtes Getreide von Krähen und Sperlingen gefressen wird. Nach von Wahl (122a) schützt Antimycel die Saaten weder gegen Vögel noch gegen Mäuse. Antimycel und Corbin setzen die Keimfähigkeit des Getreides nicht unbedeutend herab.

Ein Mittel, das die Saaten gegen Sperlinge und Lerchen genügend schützt, ohne die Keimfähigkeit zu beeinträchtigen, ist nach Müller, Molz und Morgenthaler (67) eine Mischung von 3 l Steinkohlenteer und 1 l Karbolineum; auf 1,7 Zentner Weizen wurde ½ l dieses Gemisches gebracht und der Weizen gründlich durchgeschaufelt. Sollte sich dieses Mittel auch bei weiteren Versuchen bewähren, so würde es schon wegen seiner Billigkeit vor Geheimpräparaten den Vorzug verdienen.[1])

Spieckermann (108) beschreibt eigenartige Beschädigungen an Roggen: die Ähren waren vom Halm glatt abgebissen. Nach den Beobachtungen einiger Praktiker sind diese Fraßbeschädigungen auf Zwergmäuse zurückzuführen. Auch Edler (19) teilt ähnliche Beobachtungen aus früheren Jahren mit; die Zwergmäuse kamen aus benachbarten Wäldern auf die Felder, kletterten an den Halmen empor und bissen die Ähren ab.

Nach Lang (57) ist das Räuchern gegen Feldmäuse zwecklos; bewährt hat sich jedoch das Auslegen von Strychninhafer bei gleichzeitiger Anwendung des Mäusetyphusbacillus. Auch Korff (43) hat bei seinen Versuchen mit Schwefeldämpfen recht schlechte Erfahrungen gemacht. Die Verwendung von Mäusetyphusbazillen hatte bei Korffs Versuchen (47,

---

[1]) Ritzema Bos empfiehlt bekanntlich nur Teer.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

49) Erfolg, besonders wenn gleichzeitig Giftgetreide gelegt wurde; zum Auslegen des Saccharinstrychninhafers werden von der Pflanzenschutzabteilung in München besondere Legeröhren abgegeben, die das Auslegen wesentlich erleichtern sollen. Die Wirkung von Phosphorpillen war nicht immer gut; dagegen wirkte Schwefelkohlenstoff ausgezeichnet. Wenn gegen die Verwendung dieses Mittels Bedenken wegen der Explosionsgefahr bestehen, so ist dieser Gefahr dadurch abgeholfen, daß nach Korffs Angaben eine explosionssichere Kanne „Schädlingsvertilger“ konstruiert worden ist; auf die Brauchbarkeit dieses Apparates weist auch Hiltner (37) hin. Das Cisar-Räucherungsverfahren ist nach Korff (48) nichts anderes als das bekannte oben erwähnte Schwefeln.

Literatur.

1. Anonymus, Verregnete Ernte. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 630.)
2. Appel, O., Beiträge zur Biologie der Getreide-Fusarien (Diskussion). (Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. XVII.)
3. —, Über eine Blattfleckenkrankheit am Getreide (Diskussion). (Ebenda. p. XXX.)
4. — u. Riehm, E., Untersuchungen über die Brandkrankheiten des Getreides. (Mitteil. a. d. K. Biol. Anst. Bd. 12. 1912. p. 9.)
5. Baumert, Distelvertilgung. (Zeitschr. d. Landw. Kamm. f. d. Prov. Schlesien. Bd. 16. 1912. p. 595.)
6. Bieler, Bekämpfung des Hederichs auf indirektem Wege. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 245.)
7. Breazeale, J. F. and Le Clerc, J. A., The grown of wheat seedlings as affect by acid or alkaline conditions. (U. S. Dep. of Agric. Bur. of Chem. Bull. 149. 1912.)
8. Bredemann, G., Das diesjährige starke Auftreten der Fußkrankheiten und der Schwärze des Getreides in unserm Bezirk. (Amtsbl. d. Landw. Kamm. f. d. Regbz. Cassel. Bd. 16. 1912. p. 412.)
9. —, Über den Alkaloidgehalt des Mutterkorns auf englischem Raygras (Lolium perenne). (Mykol. Centralbl. I. 1912. p. 359.)
10. —, Krankheiten und Beschädigungen der Kulturpflanzen im Jahre 1911. (Amtsbl. d. Landw. Kamm. f. d. Regbz. Cassel. Bd. 16. 1912. p. 219.)
11. Brefeld, O., Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. XV. Die Brandpilze und die Brandkrankheiten 5. Münster 1912.
12. Cieszelski, Keine Hederichvernichtung durch Kainitkopfdüngung. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 915.)
13. Clausen, Mangan und „Stimmung“ im Ackerboden. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 1131.)
14. Dale, On the fungi of the soil. (Ann. mycol. vol. 10. 1912. p. 452.)
15. Danger, L., Bekämpfung von Wildhafer. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 549.)
16. —, Huflattich auf dem Acker. (Ebenda. p. 415.)
17. Dietel, P., Über die Abschleuderung der Sporidien bei den Uredineen. (Mykol. Centralbl. I. 1912. p. 355.)
18. —, Versuche über die Keimungsbedingungen der Teleutosporen einiger Uredineen. (Centralbl. f. Bakter. Abt. II. Bd. 35. 1912. p. 272.)
19. Edler, W., Über merkwürdige Fraßbeschädigungen an Getreide. (Fühl. Landw. Ztg. Bd. 61. 1912. p. 512.)
20. Eriksson, J., Rostige Getreidekörner- und die Überwinterung der Pilzspezies. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 453.)
21. Fulmek, L., Das blaue Getreidehähnchen auf Gerste. (Wien. Landw. Ztg. 1912. No. 65. Sonderabdr.)
22. Fuschini, Dei mezzi più idonei a combattere la Carie ed il Carbone del frumento. (Le Staz. Speriment. Agr. Ital. vol. 45. 1912. p. 549.)
23. Gaul, Das Auftreten der Fritfliege im Frühjahr 1912. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 734.)
24. —, Zur Sicherstellung der Ernte. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 658.)
25. Génin, Ch., Les blés résistant à la rouille. (Journ. d'agric. prat. t. 76. 1912. p. 301.)
26. Gillette, C. P., Diabrotica virgifera Lec. as a corn root-worm. (Journ. of Econ. Entom. Vol. 5. 1912. p. 364.)

27. Grosser, Das vorzeitige Absterben des Weizens. (Zeitschr. d. Landw. Kamm. f. d. Prov. Schlesien. Bd. 16. 1912. p. 942.)
28. Gümbel, H., Untersuchungen über die Keimungsverhältnisse verschiedener Unkräuter. (Landw. Jahrb. Bd. 43. 1912. p. 215.)
29. Headlee, Th. J., The time when wheat should be sown to escape the fall brood of Hessian fly. (Journ. of Econ. Entom. Vol. 5. 1912. p. 98.)
30. Hils, E., Ursachen der Mycelbildung bei Ustilago Jensenii Rostr. [Tübinger In.-Diss] Berlin 1912.
31. Hiltner, Bericht über einen Beizversuch mit brandigem und gleichzeitig von Fusarium befallenen Winterweizen. (Prakt. Bl. f. Pflanzenb. u. Pflanzenschutz. Bd. 10. 1912. p. 26.)
32. —, Eine Voraussage! Im heurigen Jahr wird die sogen. Fußkrankheit des Getreides in stärkerem Maße auftreten. (Ebenda. p. 37.)
33. —, Über die Beizung des Saatgutes von Wintergetreide. (Ebenda. p. 97.)
34. —, Über die Beizung des Sommergetreides. (Ebenda. p. 23.)
35. —, Über die Sublimatbeizung des Getreidesaatgutes und ihre praktische Bedeutung. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 849.)
36. —, Über eine Blattfleckenkrankheit am Getreide. (Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. XXXI.)
37. —, Über einen neuen Apparat zur Verteilung des Schwefelkohlenstoffes. (Prakt. Bl. f. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz. Bd. 10. 1912. p. 66.)
38. —, Zur Beizung des Saatgetreides mit Sublimat. (Ebenda. p. 137.)
39. — und Gentner, Über die schützende Wirkung der Sublimatbeizung des Roggens gegen den Befall durch Bodenfusarien. (Ebenda. p. 129.)
40. — —, Warum sind Winterroggen und Winterweizen im Herbste 1911 vielfach schlecht aufgelaufen? (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 29.)
41. Hudig, J., De „Veenkoloniale Haverziekte“ eene eigenaardige bodenziekte, die op zandgrond aangetroffen wirdt. (Dep. van Landbouw. s'Gravenhage 1912.)
42. Jensen, C. N., Fungous flora of the soil. (Com. Univ. Argic. Exp. Stat. of the Coll. of Agric. Dep. of Plant Pathol. 1912. Bull. 315.)
43. Kadgien, Kainit zur Hederich- und Distelbekämpfung. (Illustr. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 807.)
44. Kerskun, H., Die Bekämpfung und Vernichtung der Ackerunkräuter. (Landw. Zeitschr. f. d. Rheinprov. Bd. 13. 1912. p. 683.)
45. Kirchhoff, Hederichvertilgung durch Kalkstickstoff. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 1179.)
46. Kocziez, Fr., Die chemische Zusammensetzung des Pilzbekämpfungsmittels „Forbin“. (Zeitschr. f. d. Landw. Versuchsw. in Österreich. Bd. 15. 1912. p. 755.)
47. Korff, Pflanzenschutz. (Landw. Jahrb. f. Bayern. II. 1912. p. 586.)
48. —, Das „Cisar“-Räucherungsverfahren zur Vertilgung der Feldmäuse. (Prakt. Bl. f. Pflanzenschutz Bd. 10. 1912. p. 79.)
49. —, Vergleichende Versuche über die Wirkung verschiedener Mittel und Methoden zur Bekämpfung der Feldmausplage. (Ebenda. p. 137.)
50. Kraus, C., Die Standfestigkeit der Getreidehalme. (Monatsh. f. Landw. Bd. 5. 1912. p. 332 u. Beitr. z. Pflanzenzucht. Bd. 2. 1912. p. 14.)
51. —, Die gemeine Quecke. (Agriopyrum repens P. B.). (Arb. der D. L. G. H. 220. 1912.)
52. Krause, Fr., Eine Blattfleckenkrankheit an Getreide. (Jahresb. d. Vereinig. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. 103.)
53. Krüger, Über eine Blattfleckenkrankheit am Getreide (Diskussion). (Ebenda. p. XXXI.)
54. L., Hederichvertilgung durch Kalkstickstoff. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 1144.)
55. Lang, F., Landwirtschaftliches Versuchswesen. (Landw. Jahrb. f. Bayern. Bd. 2. 1912. p. 592.)
56. Lang, W., Die Getreideernte von 1911 und das Beizen. (Württemb. Wochenbl. f. Landw. 1912. No. 13. Sonderabdr.)
57. —, Zur Bekämpfung der Feldmäuse. (Prakt. Bl. f. Pflanzenb. u. Pflanzenschutz. Bd. 10. 1912. p. 85.)
58. Lange, Ausgewachsenes Getreide. (Illustr. Landw. Ztg. 1912. Bd. 32. p. 621.)
59. Lipschütz, H., Eignet sich Kalkstickstoff zur Hederichvertilgung? (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 784.)
60. Litwinow, N., Über die verschiedene Widerstandsfähigkeit der Formen des

Sommergetreides gegen Rost. (Bull. f. angew. Bot. Bd. 5. 1912. p. 399.) [Russ. m. deutsch. Zusammenfass.]

61. Lochow, von, Einfluß der zu tiefen Unterbringung der Roggensaat auf die Ernte. (Mitt. d. D. Landw. Ges. Bd. 27. 1912. p. 505.)
62. Lomberg, E., Die Fritfliege, ihre Entwicklung und Bekämpfung. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 678.)
63. Maximow, N. A., Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen Erfrieren. (Journ. f. experim. Landw. Bd. 13. 1912. p. 24 u. 524.) [Russ. u. deutsch. Zusammenfass. u. Ber. d. D. Bot. Ges. Bd. 30. 1912. p. 52 u. 293.)
64. Molisch, H., Über den Einfluß der Radiumemanation auf die höheren Pflanzen. (Sitzungsber. d. K. Akad. d. Wiss. Wien. Mathem.-Naturw. Kl. Bd. 121. Abt. I. Okt. 1912.)
65. Mortensen, Beiträge zur Biologie der Getreide-Fusarien. (Diskussion.) (Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. XV.)
66. Müller, H. C., Molz, E. u. Morgenthaler, O., Beizempfindlichkeit des Getreides von der Ernte 1911. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 234.)
67. —, — —, Saatschutzmittel. (Ebenda. p. 862.)
68. Munerati et Hitier, Sur l'attaque du blé par la carie. Influence de l'époque de la semaille. (Journ. d'agric. prat. T. 76. 1912. p. 494.)
69. Neger, F. W., Warnung vor Corbin! (Tharandter Forstl. Jahrb. Bd. 63. 1912. p. 336.)
70. Nilsson-Ehle, H., Hvad kan göres mot gråfläckesjukan på hafre? (Sveriges Utsädesf. Tidskr. 1911. H. 1. Sonderabdr.)
71. —, Kreuzungsuntersuchungen an Hafer und Weizen. II. (Lands Univ. Arsskr. N. F. Afd. 2. Bd. 7. No. 6. 1911.)
72. —, Zur Kenntnis der Erblichkeitsverhältnisse der Eigenschaft Winterfestigkeit beim Weizen. (Zeitschr. f. Pflanzenzücht. I. 1912. p. 3.)
73. Oberbeck, A., Hederichbekämpfung durch Eggen der mit Sommerfrucht bestellten Felder bei Aufgang der Saat. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 279.)
74. Oetken, Einige Beobachtungen über Steinbrand im Weizen. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 803.)
75. Pettera, A., Superphosphat und Gips zur Bekämpfung von Getreiderost. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 382.)
76. Pieper, H., Der Windhalm (Apera spica venti). (Arb. d. D. L. G. H. 236. 1912.)
77. Plahn-Appiani, H., Die Tragfähigkeit der Getreidehalme und deren Bestimmung durch Belastungsprüfung auf Bruch. (Deutsch. Landw. Presse. Bd. 39. 1912. p. 553.)
78. Quanjer, H. M., Ontsmetting van Zavigranen met heet Water. (Dep. v. Landb. Direct v. d. Landb. 1912.)
79. Prühs, Gips als Mittel gegen Getreiderost. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 2.)
80. Raebiger, H., Bericht über die Tätigkeit des Bakteriologischen Institutes der Landwirtschaftskammer f. d. Prov. Sachsen z. Halle a. S. f. d. Jahr 1911/12. Halle 1912.
81. Raum, Züchtung und Saatbau des Fichtelgebirgshafers. (Sonderabdr. a. Landw. Jahrb. f. Bayern. 1912. H. 11.)
82. Ravn, Kølpin F., Forsøg med midler mod Rugens Staengelbrand. (Tidsskr. f. Landbr. Planteavl. 19. 1912. p. 214.)
83. Rawitscher, F., Beiträge zur Kenntnis der Ustilagineen. (Zeitschr. f. Botan. Bd. 4. 1912. p. 673.)
84. Remy u. Lüstner, Bericht über das Auftreten von Feinden und Krankheiten der Kulturpflanzen in der Rheinprovinz im Jahre 1911. (Veröffentl. d. Landw. Kamm. f. d. Rheinprov. 1912. No. 2.)
85. Richthofen, von, Brückners Disteltod. (Zeitschr. d. Landw. Kamm. f. d. Prov. Schlesien. Bd. 16. 1912. p. 782.)
86. Riedle, Verhütung der Lagergefahr bei Getreide. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 881.)
87. Robert, E., La carie du blé. (Journ. d'agric. prat. Bd. 76. 1912. p. 587.)
88. Rörig, G., Zur Verminderung der Sperlingsgefahr. (Deutsche Presse Bd. 39. 1912. p. 221.)
89. Rostrup, S., Almindelige Bekaempelses midler overfor Landbrugets Skadedyr. (Sonderabdr. a. „Dansk Landbrug" 1912.)

90. —, og Kølpin Ravn, F., Oversigt over Landbrugsplanternes sygdomme 1911. (14. Beretn. fra de Samwirk. Dansk Landbofor. Plantepat. Forsogswirks 1912.)
91. Sabarth, F., Distelvertilgung. (Zeitschr. d. Landw. Kam. f. d. Prov. Schlesien Bd. 16. 1912. p. 559.)
92. Schaffnit, E., Beiträge zur Biologie der Getreide-Fusarien. (Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. 39.)
93. —, Biologische Gesichtspunkte für die Samenprüfung. (Illustr. landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 738.)
94. —, Der Schneeschimmel und die übrigen durch Fusarium nivale Ces. hervorgerufenen Krankheitserscheinungen des Getreides. (Sonderabdr. a. d. Landw. Jahrb. Bd. 43. 1912.)
95. —, Die Herstellung und Vorbereitung des Saatgutes. (Fühlgs. Landw. Ztg. Bd. 61. 1912. p. 665.)
96. —, Mängel des Saatgutes aus der diesjährigen Halmfruchternte. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 665.)
97. Schander, R., Versuche zur Bekämpfung des Flugbrandes in Weizen und Gerste mittels Heißwassers und Heißluft. (Mitt. d. K.-Wilhelms Inst. f. Landw. Bd. 4. 1912. p. 416.)
98. —, Versuche zur Bekämpfung des Flugbrandes von Gerste und Weizen durch die Heißwasserbehandlung im Sommer 1912. (Ebenda Bd. 5. p. 125.)
99. Scherpe, R., Die Kupferkalkbrühe, ihre Bereitung und Verwendung und andere kupferhaltige Pflanzenschutzmittel. (K. Biol. Anst. Flugbl. 52. 1912.)
100. Schewelew, J., Eine exakte Methode vollständigen Absonderns sämtlicher Samen aus dem Boden. [Russ. u. deutsche Zusammenfassung.] (Bull. f. angew. Bot. Bd. 5. 1912. p. 33.)
101. Schmidt, Kainit zur Distelvertilgung. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 890.)
102. Schoyen, W. M., Beretning om skadeinsekter og plantesygdommer i land- og harebruket 1911. Christiania 1912.
103. Schulze, B., Corbin und Cuprocorbin als Schutzmittel der Saaten gegen Vogelfraß und Brandbefall. (Zeitschr. d. Landw. Kam. f. d. Prov. Schlesien Bd. 16. 1912. p. 1328.)
104. Seelhorst, v., Der Einfluß des Standortes auf die Entwicklung der Getreidearten, speziell der Göttinger Zuchten. (Jahrb. d. D. L. G. Bd. 27. 1912. p. 374.)
105. Simon, J., Die Bekämpfung des Hederichs in Serradella. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 183.)
106. Snell, K., Über das Vorkommen von keimfähigen Unkrautsamen im Boden. (Landw. Jahrb. Bd. 43. 1912. p. 323.)
107. Sperling, E., Der Einfluß des Steinbrandes auf die Form der Weizenähren. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 793.)
108. Spieckermann, A., Über eine merkwürdige Fraßbeschädigung an Roggen. (Prakt. Bl. f. Pflanzenb. u. Pflanzensch. Bd. 10. 1912. p. 53.)
109. Stäger, R., Infektionsversuche mit überwinterten Claviceps-Konidien. (Mykol. Centralbl. Bd. 1. 1912. p. 198.)
110. Störmer, K., Die Streifenkrankheit der Gerste. (Deutsche Landw. Presse Bd. 39. 1912. p. 587.)
111. — u. Kleine, R., Das Auftreten der Rübennematoden an Hafer, sowie die Dörrfleckenkrankheit des Hafers. (Deutsche Landw. Presse Bd. 39. 1912. p. 599.)
112. — —, Das Auftreten des Meltaues (Erysiphe graminis) am Winterweizen und anderen Getreidearten. (Deutsche Landw. Presse Bd. 39. 1912. p. 600.)
113. — —, Die Drahtwürmer. (Ebenda p. 505.)
114. — —, Über das Auftreten von Fußkrankheiten an Weizen und Roggen. (Ebenda p. 718.)
115. — —, Zu spät gesäter oder in der Entwicklung zurückgebliebener Sommerweizen wird stark durch die Halmfliege befallen. (Ebenda p. 719.)
116. —, Ruhland, K., Kleine, R. u. Spieckermann, Anbauversuche mit Wintergerste. (Ebenda p. 759.)
117. Straňák, Fr., Ein Beitrag zur Erkenntnis der phytopathologischen Bedeutung der Getreideblasenfüße. (Ebenda p. 771.)
118. —, Mechanisches Messen des Widerstandes der Getreidearten gegen Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschädlinge. (Zeitschr. f. d. ges. Getreidewesen Bd. 3. 1912. p. 37.)

119. Sydow, H. et P. u. Butler, E. J., Fungi Indiae orientalis. (Ann. Mycol. Bd. 10. 1912. p. 243.)
120. Vielhaack, Pflege der Saaten im Frühjahr. (Jahrb. d. D. L. G. Bd. 27. 1912. p. 140.)
121. Voges, E., Zur Fußkrankheit des Getreides. (Deutsche Landw. Presse Bd. 39. 1912. p. 815.)
122. v. Wahl, N., Nochmals die baltische Korndarre und der baltische Getreidereuter. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 904.)
122a. —, Der Saatschutz mit Antimycel (Bad. landw. Wochenbl. 1912. p. 911.)
123. Webster, R. L., Some further notes on the wheat-head army worm. (Journ. of Econ. Entom. Vol. 5. 1912. p. 335.)
124. Wehsarg, O., Das Unkraut im Ackerboden. (Arb. d. D. L. G. H. 226. 1912.)
125. Westerdijk, Über eine Blattfleckenkrankheit am Getreide [Diskussion]. (Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. XXX.)
126. Wiedersheim, W., Das Klettenlabkraut (Kleber) (Galium Aparine L.). (Arb. d. D. L. G. H. 203. 1912.)
127. Wieler, Pflanzenwachstum und Kalkmergel im Boden. Berlin 1912.
128. Wilcox, E. M., Smuts of Nebraska cereals. (Agric. Exp. Stat. of Nebraska. vol. 25. Bull. 131. 1912.)
129. Wollenweber, H. W., Beiträge zur Biologie der Getreidefusarien [Diskussion]. (Jahrb. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 9. 1912. p. XVII.)
130. Wüst, Eingeschleppte Unkräuter. (Prakt. Bl. f. Pflanzenb. u. Pflanzensch. Bd. 10. 1912. p. 89.)
131. Zade, A., Der Flughafer. (Arb. d. D. L. G. H. 229. 1912.)
132. —, Die Zwischenformen vom Flughafer (Avena fatua) und Kulturhafer (Avena sativa). (Fühlgs. Landw. Ztg. Bd. 61. 1912. p. 369.)
133. Ziehe, Verhinderung der Lagergefahr bei Getreide. (Illustr. Landw. Ztg. Bd. 32. 1912. p. 761.)
134. Zwick, Fischer u. Winkler, Untersuchungen über die Wirkung brandsporenhaltigen Futters auf die Gesundheit der Haustiere. (Arb. a. d. K. Ges.-Amt Bd. 38. 1912. p. 450.)

Referate.

Fuhrmann, F., Vorlesungen über technische Mykologie. 8⁰. VIII u. 454 pp. m. 140 Textabb. Jena (G. Fischer) 1913. geh. 15 Mk., gebd. 16 Mk.

Das vorliegende Werk ist speziell für Studierende der Naturwissenschaften sowie angehende Mykologen bestimmt. Dementsprechend sind die allgemeineren Fragen ausführlicher, die speziellen, technischen Erörterungen dagegen kürzer gehalten. Zur weiteren Informierung ist aus dem gleichen Grunde meist auf die verschiedenen Handbücher, seltener auf die Original-Arbeiten verwiesen. Wie Verf. im Vorworte betont, sollte auch ein Eingehen auf wissenschaftliche Streitfragen vermieden werden, „um den Anfänger durch vielerlei Meinungen nicht unsicher zu machen“. Bei der Ausarbeitung wurde, wie noch zu zeigen sein wird, diesem Prinzip allerdings nicht immer Rechnung getragen.

Das Buch ist in 32 Vorlesungen eingeteilt. Nacheinander werden die folgenden Gebiete behandelt: Geschichte der technischen Mykologie — Definition der Begriffe: Bakterien, Hefen und Schimmelpilze — Morphologie und Physiologie der Bakterien — Sterilisation und Desinfektion — Fäulnis und Verwesung — Stickstoffbindung — Bakterien in Milch, Butter und Käse — Buttersäuregärung, Zellulose- und Pektingärung — Selbsterhitzung und Selbstentzündung, Heu und Sauerfutterbereitung, Kaffee- und Kakaofermentation, Mykologie der Gerberei — Einsäuerung von Gemüse, Fadenziehen des Brotes, bakterielle Senfzersetzung — Essigbakteriologie — Bakterien bei der Zuckerfabrikation, Farbstoffgärungen, Schwefel- und Purpurbakterien — Eisenbakterien, Nahrungsmittelkonservierung — System der Bakterien — Morphologie und Physiologie der Hefepilze — Hefereinzucht, Morphologie und Physiologie von Mycoderma und Torula — System der Sproßpilze — Alkoholische Milchgetränke, Bier- und Weinkrankheiten — Schimmelpilze — Selbstreinigung der Gewässer und Abwassermykologie.

Wie aus dieser (hier z. T. konzentrierten) Inhaltsübersicht hervorgeht, sind gerade die Hauptfragen der technischen Mykologie i. e. S. verhältnismäßig sehr kurz (auf kaum 100 Seiten) behandelt. Die Weinbereitung fehlt (bis auf die Weinkrankheiten) ganz. Auch Brennerei und Brauerei hätten speziell mit Rücksicht auf den Zweck des Buches und dem Titel „technische Mykologie“ entsprechend nach Ansicht des Ref. eine ausführlichere Darstellung verdient. In den der allgemeinen und der landwirtschaftlichen Bakteriologie gewidmeten Kapiteln würden sich unschwer die nötigen Kürzungen durchführen lassen. Bedenklicher als dieser Mangel an Gleichgewicht scheint mir allerdings — speziell für ein Lehrbuch — die oft recht eigenartige Verteilung des Stoffes zu sein. Z. B. ist vom Bakteriensystem in der 1. und dann erst wieder in der 24. Vorlesung die Rede, nachdem die gesamte Bakteriologie abgehandelt ist. Die Darlegungen über Enzyme der Bakterien, z. T. auch der Hefen, finden sich in Vorlesung 7—9, danach folgt die Bildung von Farbe und Licht, dann die physikalischen Eigenschaften der Bakterienzelle und erst hiernach die nötigen Angaben über Ernährung und Stoffwechsel der Bakterien. In der 13. Vorlesung wird die Sterilisation und Desinfektion behandelt, aber erst in der 23. Vorlesung folgt im Verein mit den Eisenbakterien die Nahrungsmittelkonservierung. In der 16. Vorlesung lesen wir von der Säuerung der Milch; die orientalischen Sauermilchsorten (Mazun, Jaourt usw.) finden sich in der 30. Vorlesung zusammen mit den Krankheiten von Wein und Bier. Ich fürchte, diese und andere Inkonsequenzen werden manchen Studierenden nicht zur wünschenswerten Klarheit kommen lassen.

Abbildungen sind in reicher Zahl und in im ganzen guter Auswahl beigegeben, doch ist ein ansehnlicher Teil von ihnen (in der gewiß lobenswerten Absicht, das Wichtigste besonders hervorzuheben) so stark schematisiert, daß der Anfänger sich im mikroskopischen Bilde selbst nur sehr schwer danach zurechtfinden dürfte. Die schematischen Darstellungen der N- und der C-Umsetzungen lassen meines Erachtens, trotzdem „der Deutlichkeit halber“ einige wichtige Umsetzungen gar nicht eingezeichnet wurden, an Klarheit doch recht viel zu wünschen übrig.

Eine stattliche Reihe von Druckfehlern ist nachträglich berichtigt worden. Leider ist aber die Zahl der nicht berichtigten Druck- und der mehrfach wiederkehrenden Schreibfehler (Schyzophyten, Schyzosaccharomyzeten, terratologische Wuchsformen usw.) noch recht erheblich. Nur andeutungsweise mögen einige der Verbesserung bedürftige Einzelheiten der Darstellung namhaft gemacht sein. p. 162 wird die Fäulnis als anaërobe, die Verwesung als aërobe Eiweißzerlegung definiert, p. 164 wird von den aëroben Fäulnisbakterien gesprochen. p. 122 werden (durch Fettdruck hervorgehoben) die Salpeterzersetzer als Nitrobakterien bezeichnet, p. 168 ff. dagegen die Salpeterbildner. Die Angabe (p. 172), daß nur in Erde Nitrit- und Nitratbildung gleichzeitig verlaufen, während dies in der Lösung nicht stattfinde, und daß die Ursachen dieser Differenzen unbekannt seien, ist nicht zutreffend. Das gleiche gilt in bezug auf die monotriche Begeißelung des Azotobacter (p. 187). Neben den aëroben Zellulosebakterien (p. 229) hätten wohl auch die zellulosezersetzenden Schimmelpilze eine kurze Erwähnung verdient. Die Darstellung der Physiologie der Eisenbakterien (p. 302 f.) hätte auf Grund der schon 1911 erschienenen Arbeiten Lieskes zweifellos eine Umarbeitung erfahren müssen. Sehr bedauerlich ist auch die erneute Verwechslung der verschiedenen Milchsäurebakteriennamen. p. 197 wird Bacterium Leichmanni (ob eines der drei von Henneberg oder das von Weigmann, ist nicht gesagt) mit Bacillus (!) lactis acidi, Bacterium Güntheri (seit Jahren von Lehmann und Neumann gestrichen), Bacillus lacticus (von Kruse längst in Streptococcus lacticus umgewandelt) und Streptococcus lactis synonym erklärt. Umso befremdender wirkt dann die Behauptung (p. 203), daß die vom Ref. gewählte Gruppierung der Milchsäurebakterien „keineswegs wissenschaftlich“ sei. Offenbar läßt die Orientierung des Verf.s auf dem in Rede stehenden Gebiet nicht nur in der eben angedeuteten Richtung zu wünschen übrig. Andernfalls müßte es ihm bekannt sein (und vom Verf. eines Lehrbuches, der sich darin derartige Kritiken erlaubt, muß man das entschieden erwarten), daß speziell die Einordnung der gewöhnlichen Milchsäurebakterien, die seinerzeit von Leichmann zu Unrecht als Bacterium lactis acidi bezeichnet worden sind, in die Gruppe der Streptokokken durchaus nicht „in besonderem Maße“ unwissenschaftlich ist, sondern daß sie fast ausnahmslos von sämtlichen namhaften Bakteriologen (ich nenne hier nur Beijerinck, Burri, Orla Jensen, W. Kruse, K. B. Lehmann) vertreten wird. Wie es scheint, hat sich Verf. durch seinen Glauben, daß, wie es Migula vor längerer Zeit (als man über den Formenkreis der Streptokokken noch nicht genügend orientiert war) forderte, die Streptokokken stets runde Zellen zeigen müßten, zu diesem, wie gesagt, sehr bedauerlichen Exkurs verleiten lassen. Durchaus unklar ist mir übrigens der folgende Satz geblieben: „Auch die einseitig zugespitzten Formen dürfen nicht als Kokken bezeichnet werden, wenn wir nicht die vorläufige, mühsame Formfeststellung einfach über Bord werfen wollen.“ Ich weiß weder, inwiefern diese „vorläufige Formfeststellung“ so besonders „mühsam“ sein soll, noch wie dieses schwierige Werk durch die Bezeichnung der lanzettlichen Formen als Kokken Schaden leiden sollte. Will Verf. etwa den Streptococcus lanceolatus wieder zum Genus Bacterium versetzen? Falls ihm das notwendig erscheint, dann darf er aber konsequenterweise auch keinesfalls die Kokken als Bakterien bezeichnen (denn *βακτηϱία* heißt ja der Stab!); das wäre doch ebenso „unwissenschaftlich“ wie eine mitunter längliche Form zu den Kokken zu rechnen.

Mit diesen Bemerkungen mag es sein Bewenden haben. Sie dürften aber genügen, um es begründet erscheinen zu lassen, wenn ich meine Ansicht über das Buch in folgende Sätze zusammenfasse. Soweit es sich um eine Einführung in die allgemeine Bakteriologie handelt, muß ich Beneckes „Bau und Leben der Bakterien“ jedenfalls den Vorzug geben. Die allgemeine sowie die technische Mykologie ist in den betreffenden kleinen Lehrbüchern von Kossowicz zweifellos klarer und namentlich im speziellen Teile auch vollständiger behandelt. Gleichwohl wäre ein zusammenfassendes, vom botanischen Standpunkte aus geschriebenes Werk gerade jetzt um so mehr willkommen, als wir infolge des vorzeitigen Ablebens A. Fischers wohl kaum mehr eine zeitgemäße Neubearbeitung seiner vorzüglichen, aber leider mehr und mehr veraltenden Vorlesungen erwarten dürfen. Selbstverständlich liegt es mir durchaus fern, etwa die Behauptung aufstellen zu wollen, daß die „Vorlesungen“ Fuhrmanns nicht auch in ihrer jetzigen Form von den Studierenden mit Nutzen durchgearbeitet werden können. Aber sie würden bei einer Neubearbeitung zweifellos erheblich gewinnen, wenn sie sowohl formell wie sachlich einer gründlichen Revision unterzogen würden, denn gerade bei einem Werke, das zu wissenschaftlichem Denken und Arbeiten erziehen soll, ist m. E. eine straffe, konsequente und möglichst exakte Art der Darstellung geradezu unentbehrlich. Daß die Ausstattung des Buches tadellos ist, braucht beim Verlag G. Fischer keiner besonderen Betonung.

Löhnis (Leipzig).

International **Catalogue** of Scientific Literature. Tenth annual Issue. M. Botany. 8⁰. 840 pp. London 1913. 39 sh.

Zum 10. Male erscheint der International Catalogue, im wesentlichen das Jahr 1910 umfassend. Gegenüber der bereits im Jahrgang vorher etwas geänderten Zitierung im speziellen Teil ist alles in dem bisherigen Zustande geblieben.

Es sind diesmal über 7000 Arbeiten im alphabetischen Index aufgenommen. Das Ziel, wonach der Catalogue strebt, nämlich die absolute Vollständigkeit, wurde auch jetzt noch nicht erreicht, da die Berichterstattung aus einzelnen Ländern viel zu wünschen übrig läßt. Weshalb z. B. Amerika die zahllosen Veröffentlichungen seiner Agricultural Experiment Stations nicht aufnimmt, ist nicht recht einzusehen, denn es befinden sich viele wichtige Arbeiten unter diesen Veröffentlichungen. So ließe sich noch manche andere Lücken feststellen, aber man muß immer noch die verhältnismäßige Jugend des ganzen Unternehmens in Betracht ziehen.

Besonders erfreulich ist die Vollständigkeit in der deutschen, englischen, russischen, nordischen Literatur. Aber von den übrigen Ländern dürfte von den wichtigen Arbeiten kaum eine fehlen, wenigstens ließ sich dies für die pilzliche Literatur leicht feststellen.

Das Werk sollte eine viel größere Verbreitung haben; vor allem sollte jedes größere Institut als Ergänzung zu Justs Jahresbericht, in dem die Literatur oft recht mangelhaft zitiert ist, diese Serie mithalten. Wahrscheinlich ließe sich bei zahlreicheren Vorbestellungen auch der Preis wesentlich herabsetzen.

G. Lindau (Berlin).

Meyer, A., Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop. (Arch. f. Protistenk. Bd. 24. 1911. p. 76.)

Im normalen Dunkelfelde sind die Bakterien sehr leicht sichtbar, wenn sie in einem optisch leeren Substrate liegen. Die Membran tritt scharf hervor, bei mancher Einstellung aber kann das Bild derselben ganz verschwinden. Bei Stäbchen treten an den Polen zwei helle Punkte auf, bei Kugeln 4 solche, die nur durch die starke Krümmung der Membran an diesen Stellen erzeugt werden. Fett und Volutin leuchten sehr stark im Dunkelfeld, so daß sie kaum auseinanderzuhalten sind. Stellt man bei Gegenwart dieser Stoffe normal ein, so ist die Membran wegen Überstrahlung nicht oder kaum zu erkennen. Ist Glykogen oder Iogen im Cytoplasma vorhanden, so sieht man die Membran nur schwach. Die Membran der Sporen leuchtet stark auf; die fertigen Sporen erkennt man leicht an dem dunklen Kern, der den Fetttropfen überhaupt fehlt. Den Zellkern sah Verf. nie im Dunkelfeld, das Cytoplasma hellt das letztere kaum auf. Die Geißeln leuchten bei genügender Dicke deutlich auf. Diese Winke sind sehr gut, weil sie zeigen, daß jeder,

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

der an das Studium der Bakterien im Ultramikroskop herangeht, zuerst bei gewöhnlicher Beleuchtung (Hellfeld) diese studiert haben muß. Man sieht im Dunkelfeld gewisse Sachen leichter und auffälliger, mehr aber als im Hellfelde sieht man nicht. Matouschek (Wien).

Vouk, V., Die Lebensgemeinschaften der Bakterien mit einigen höheren und niederen Pflanzen. (Die Naturwissenschaften. Jg. 1. 1913. p. 81—87, Fig.)

Eine Schilderung aller bisher bekannt gewordenen Fälle. Es wird besonders auch darauf hingewiesen, daß die Bakterien eine enge Beziehung zu den Myxomyceten haben. Wenn auch die Schleimpilze mit verschiedenen Bakterien in Gemeinschaft leben, so ist doch sehr auffallend, daß in den meisten Fällen bloß Bacillus fluorescens var. liquefaciens Flügge als Begleiter gefunden worden ist. Die Bakterien begleiten den Myxomyceten während der ganzen Entwicklung. Verf. zeigt uns folgendes: Läßt man die Sporen von Didymium in einer feuchten Kammer im hängenden Tropfen einer Nährlösung keimen, so treten nach 12 Stunden schon Schwärmer auf, zugleich aber sieht man stäbchenförmige Bakterien um die pulsierende Vakuole. Der aus den Vakuolen ausgeschiedene Stoff mit der chemotaktischen Eigenschaft dient einfach zur Anlockung der Bakterien, die dann von den Amoeben in bekannter Weise verdaut werden. An Hand seiner Präparate zeigt Verf., daß schließlich der Myxomycet über die Bakterien siegt. Wird dem Agar aber etwas Pepton beigegeben, so entwickeln sich die Bakterien aber viel stärker, die Plasmodien kommen nicht einmal zur Entwicklung. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß die symbiotischen Bakterien auf gewöhnlichen Nährböden leicht zu züchten sind, was mehr für ihre saprophytische Natur und den epiphytischen Charakter spricht. Verf. bespricht noch das Verhalten der Bakterien zu Plasmodiophora Brassicae (Pinoy) und die Lebensgemeinschaft derselben mit einigen Florideen (Schmitz). Matouschek (Wien).

Kendall, A. J. and **Farmer, Ch. J.,** Studies in Bacterial Metabolism. VII. (Journ. Biol. Chem. Vol. 13. 1912. p. 63—70, w. 9 curves.)

Diese Mitteilung bezieht sich auf das Zusammenwirken von „Fermentation“ und „Fäulnis“. Die Ammoniak-, Alkali- und Säureproduktion einiger Bakterien (B. proteus, coli, paratyphus, typhosus, alcaligenes, Vibrio H. 61, Microc. aureus und Streptoc. No. 34) wurde in zuckerfreier und in Dextrose-Bouillon geprüft. Meist war im zuletzt genannten Falle die Ammoniakbildung gehemmt. Zuckerabwesenheit bedingte in der Regel Alkali-, Zuckergegenwart dagegen Säureproduktion. Nur B. alcaligenes und Vibrio H. bildeten stets Alkali, Streptoc. No. 34 stets Säure. Auch Microc. aureus zeigte in den ersten Tagen stets Säurebildung, dagegen wurde später in der (wahrscheinlich nicht völlig) zuckerfreien Bouillon die Reaktion gleichfalls alkalisch. Löhnis (Leipzig).

Shibata, K., Untersuchungen über lockere Bindung von Sauerstoff in gewissen farbstoffbildenden Bakterien und Pilzen. (Jahrb. f. wissensch. Bot. Bd. 51. 1912. p. 179—235.)

Schon Ewart hat die Beobachtung gemacht, daß Pigmentbakterien, ähnlich wie das Hämoglobin, den Luftsauerstoff in lockerer Bindung aufspeichern können, den sie unter gewissen Bedingungen wieder abzugeben vermögen. Eine Rosahefe und Monascus purpureus können das gleiche tun, vielleicht auch Epicoccum purpurascens und Acrostalagma cinnabarinus. An den gefärbten Konidien von Monilia sitophila, Aspergillus niger und einigen Penicillium-Arten bemerkte Verf. aber keine Sauerstoffspeicherung. Tierisches Blut wurde behufs der Kontrolle herangezogen. Die von den Bakterien und Pilzen erzeugten lipochromen Farbstoffe sind wohl das O-bindende Agens; nur bei Monascus bemerkte Verf. auch Farbenveränderung, welche die O-Bindung begleitet. — Worin liegt die biologische Bedeutung der O-Speicherung? Die aëroben Organismen können mitunter vorübergehend einen totalen O-Mangel erleiden, den sie aber durch Veratmung ihres O-Vorrates wieder ausgleichen. Die Farbstoffe fungieren aber nur als O-Speicher, nicht als O-Überträger. Matouschek (Wien).

Abderhalden, Emil, Fromme, Georg u. Hirsch, Paul, Die Bildung von γ-Aminobuttersäure aus d-Glutaminsäure unter dem Einfluß von Mikroorganismen. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 131.)

Neue Versuche zum Nachweis der γ-Aminobuttersäure mit der Estermethode bei der bakteriellen Spaltung der d-Glutaminsäure bestätigen die Angaben Ackermanns (diese Zeitschr., Bd. 69. 1910. p. 273) über das Auftreten dieser Säure. Vermutlich handelt es sich aber dabei um kein regelmäßiges Abbauprodukt der Glutaminsäure.

Hermann Strauß (Berlin).

Abderhalden, Emil u. Fodor, Andor, Versuche über die bei der Fäulnis von l-Asparaginsäure entstehenden Abbaustufen. Eine neue Methode zum Nachweis von β-Alanin. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 112.)

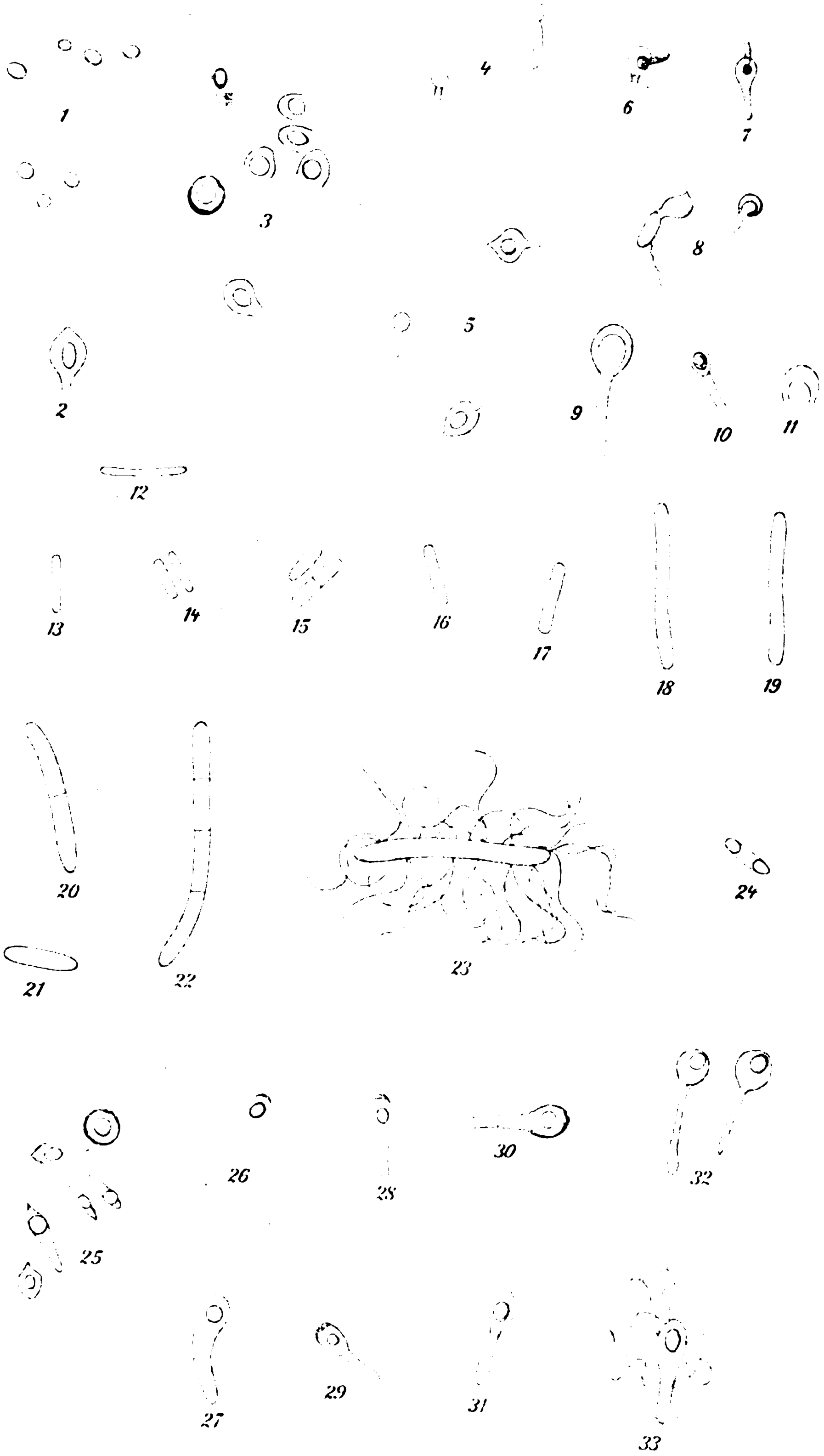
Bei der Fäulnis von Asparaginsäure konnte Abderhalden die Bildung von Bernsteinsäure, Propionsäure und Ameisensäure mit der Estermethode nachweisen und damit die Befunde von Neuberg und Capperruoli bestätigen. Ackermann hat nun angegeben, daß hierbei auch β-Alanin entsteht. Obgleich nun Verff. durch die Überführung des β-Alaninesters in Acrylsäureester eine neue Methode zum Nachweis von Spuren β-Alanin gefunden und bei ihren Fäulnisversuchen angewendet haben, konnten sie in keinem Falle β-Alanin finden. Diese Divergenz wird auf unbekannte Abweichungen in der Bakterienflora der Fäulnisflüssigkeiten zurückgeführt und erfordert genauere Angaben über Ackermanns Versuchsbedingungen. Bezüglich der experimentellen Einzelheiten sei auf das Original verwiesen (vergl. Ackermann, Zeitschr. f. Biol. Bd. 56. 1911. p. 87). Hermann Strauß (Berlin).

Czepa, Alois, Organismenleuchten und Zweckmäßigkeit. (Naturwiss. Wochenschr. N. F. Bd. XI. 1912. p. 609—613.)

Dem Humusleuchten, das bedingt wird durch zerfallende organische Verbindungen, ist eine große Rolle zuzuschreiben (siehe Weitlaners Arbeiten über das Johanniskäferchen, Verhandl. d. k. k. zool. bot. Ges. in Wien. 1909 und 1911). Von einer Zweckmäßigkeit des Leuchtvorganges kann nicht die Rede sein. Bei Meerestieren mit Leuchtorganen, die kom-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Centralblatt f. Bakteriologie. Abt. II. Bd. 39. ***Viehoever,*** *Bakterien.* *Taf. I.*


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

pliziert gebaut sind, mag das Leuchten unbedingt eine Bedeutung für das Leben des Tieres haben. Doch sind hier die einzelnen Fälle noch viel zu wenig untersucht worden. Der vorzüglichste Zweck des Leuchtens dürfte darin liegen, das gegenseitige Auffinden der Geschlechter zu begünstigen. Hierfür ist das Johanniskäferchen ein Beispiel. Weitlaner zeigte, daß die übermäßige Ansammlung des harnsauren Ammoniaks zur Zeit der Eiablage den Tod dieses Insektes mit sich bringt. Knapp nach der Ablage stirbt das Tier. Hier also dient das Leuchten nicht beim Nahrungserwerb, wie etwa bei manchen Meerestieren es angenommen werden kann.

Matouschek (Wien).

Broquin-Lacombe, A., Sur un pigment bleu du Bacillus mesentericus niger. (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 74. 1913. p. 331—332.)

B. indique que Bacillus mesentericus niger cultivé en milieu synthétique, utilisé par Lasseur pour Bacillus chlororaphis Guignard et Sauvageau, en présence d'oxygène, produit un voile grisâtre, le liquide est coloré en bleu. Au bout d'un certain temps le voile devient brun et le liquide brun-noirâtre. En tube scellé le voile gris formé est peu abondant, il ne brunit pas, la couleur bleue se produit en tubes scellés, mais elle est moins intense qu'en présence d'oxygène. Kufferath (Bruxelles).

Kostytschew, S., Hubbenet, E. u. Scheloumoff, A., Über die Bildung von Acetaldehyd bei der anaeroben Atmung der Pappelblüten. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83. 1913. p. 105.)

Untersuchungen der anaeroben Atmung der Pappelblüten bestätigten die Auffassung, daß hierbei das Verhältnis $CO_2 : C_2H_5OH$ nicht der Gleichung der alkoholischen Gärung entspricht. Vielleicht aber findet eine Analogie zwischen der hierbei stattfindenden Acetaldehydbildung und derselben bei der alkoholischen Gärung statt. Hier wird die Reduktion des Acetaldehyds zu Äthylalkohol durch die beträchtliche Menge von Oxydasen und labilem Sauerstoff, der die Oxydation des aktiven Wasserstoffs der Reduktasen bewirkt, verhindert. Der CO_2-Überschuß bei dieser Atmung beruht wohl nicht auf der Oxydation von Zucker, da der geringe Zuckergehalt der Blüten rasch verbraucht wird. Hermann Strauß (Berlin).

Issatschenko, B. L., Ob otloženi sěristago žělězna vnutr bakteriy. [=Über die Ablagerung von schwefeligem Eisen in den Bakterien.] (Bull. du jard. bot. Impér. de St. Pétersbourg. T. XII. 1912. p. 134—139. 1 Taf.)

In einer Wasserprobe des Baltischen Meeres fand Verf. Microspira desulfuricans, die eine Schwefelwasserstoffgärung hervorruft (60—282 mg pro Liter). An den Wänden des Gefäßes trat ein schwarzes Häutchen auf und unten ein starker Satz, der aus beweglichen Bakterien bestand, die in ihrem Innern auch schwefeliges Eisen enthielten. Die Tafel zeigt die lebenden ungefärbten Bakterien. Die schwarzen Bakterien sind jene, in denen dieser Stoff abgelagert ist; die wenig bemerkbaren farblosen enthielten kein Eisen. Die weiteren Untersuchungen werden beweisen, ob die Bildung des schwefeligen Eisens unter der Einwirkung des H_2S des Substrates oder aber infolge der Wirkung des in dem Stäbchen selbst gebildeten H_2S entsteht. Matouschek (Wien).

Sawamura, S., On Bacillus Natto. (VIII. Internat. Congress of Appl. Chemistry. 1912. Orig. Communicat. Vol. 14. p. 145—147.)

Stets ist in Natto der spezifische nicht näher beschriebene Bacillus Natto vorhanden. Es ist eine Form aus der Mesentericusgruppe, die schwach Säure bildet, Kasein rasch auflöst, etwas Schleim und das spezifische Nattoaroma produziert. Löhnis (Leipzig).

Bainier, G. et **Sartory, A.,** Étude biologique et morphologique de certains Aspergillus. [Suite.] (Bull. Soc. myc. France. T. XXVIII. 1912. p. 257—269. Pl. X—XII.)

Beschreibung des biologischen und morphologischen Verhaltens von Aspergillus Scheelei, A. B. var. Scheelei und A. umbrosus. Die beiden erstgenannten Pilze zeigen nahverwandte Charaktere, ihre kulturelle und biologische Eigenschaften sind jedoch zum Teil verschieden und zwar: 1. Asp. Scheelei produziert nicht die für die Varietät Scheelei charakteristische blaue Fluoreszenz. 2. Asp. Scheelei koaguliert die Milch nicht, was die Varietät Scheelei tut. Lakon (Tharandt).

Sauton, R., Sur la sporulation de l'Aspergillus fumigatus. (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 74. 1913. p. 38.)

S. indique que si on supprime du liquide de Raulin S, Fe, Mn et K ils ne se forment pas de conidies dans les cultures d'Aspergillus fumigatus. L'absence d'O agit de même. H. Kufferath (Bruxelles).

Schiemann, E., Mutation bei Aspergillus niger van Tieghem. (Zeitschr. ind. Abst.-Vererbungslehre. VIII. 1912. p. 1—35.)

Bei Anwendung von Giften (z. B. $K_2Cr_2O_7$) als Reizmittel auf Kulturen des genannten Pilzes bemerkte Verf. das Auftreten von zwei Farbenmutationen: Die fuscus-Mutante erhielt sich durch 40 Generationen und zeigte braune Konidienköpfe, die cinnamomeus-Mutante aber weiße bis zimtfarben abtönende. Wandte Verf. extreme Temperaturen an, so kam es einmal zur Ausbildung einer hochwüchsigen Mutante (Aspergillus altipes), doch nicht gleich in der ersten Generation, welche sonderbarerweise einen zwerghaften Eindruck machte. Die beiden erstgenannten Mutationen sind Verlustmutationen, da die beim Normalpilze den schwarzen Farbstoff aufweisenden Wärzchen entweder stark reduziert werden oder gar ganz fehlen. Von den bereits bekannten braunen Arten ostianus und ochraceus vermutet Verf., daß sie wohl auch durch Mutation aus der Normalform A. niger hervorgegangen sind. — In Hitzekulturen trat aber in den Versuchsreihen des Verf. noch eine braune Mutante auf, die sich auszeichnet durch große Variabilität in Farbe und Wuchs (Asp. proteus), durch Färbungsumschläge auf Änderungen der Temperatur hin und durch Rückschlag auf den Typus nach Verlauf von etwa drei Wochen. Die genannten Mutanten des Verf. erwiesen sich als konstant mit Ausnahme der cinnamomeus-Mutante. Matouschek (Wien).

Sartory, A. et **Sydow, H.,** Etude biologique et morphologique d'un Aspergillus nouveau, A. Sartoryi Syd. n. sp. (Annal. mycol. T. 11. 1913. p. 156—160, tab.)

Die Art stammt von den Goldminen von Johannesburg und fand sich in einer Tiefe von fast 700 m bei einer Temperatur von ca. 113° F. Sie be-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

deckte den Boden, der mit einer etwas zuckerhaltigen Lösung zur Bindung des Staubes getränkt war. In der Kultur erwies sich die sehr große Art als thermophil, die am besten bei etwa 48° C wächst. Sie wächst auf allen gebräuchlichen Kulturmedien, verflüssigt Gelatine, koaguliert Milch. Die Zuckerarten, die assimiliert werden, lassen sich in der Reihe anordnen: Glykose, Saccharose, Maltose, Galaktose, Lävulose, Laktose und Inulin. Die Tafel zeigt die Größenverhältnisse des merkwürdigen Pilzes. Der Pilz ist nicht pathogen. Lindau (Berlin).

Bainier, G. et **Sartory, A.,** Étude d'un Penicillium nouveau, Penicillium Herquei n. sp. (Bull. Soc. mycol. France. T. XXVIII. 1912. p. 121—126. Pl. VII.)

Penicillium Herquei n. sp. wächst auf allen den in der Mycologie üblichen Substraten. Auf Karotten, Kartoffeln, Raulin, Bananen u. dgl. scheidet der Pilz ein gelbes Pigment aus (entsprechend der Farbe 206 der Klincksieck und Valetteschen Farben); auf peptonhaltigen Substraten ist das Pigment grün (Farbe Nr. 326). Das Pigment ist löslich in Äther, Alkohol, Azeton, Benzin, Schwefelkohlenstoff usw., also in allen Lösungsmitteln der Fette. Es gehört zu den Lipochromen Zopfs. Der Pilz bringt die Milch zur Koagulation und verflüssigt die Gelatine nicht. Lakon (Tharandt).

Bainier, G. et **Sartory, A.,** Étude de deux Penicillium nouveaux producteurs de pigment. (Bull. Soc. mycol. France. T. XXVIII. 1912. p. 270—279. Pl. XIII.)

Penicillium divergens n. sp. ist kurz gesagt ein zusammengesetztes Penic. granulatum. Es wächst fast auf allen in der Mykologie üblichen Substraten. Es bringt die Milch zur Koagulation und verflüssigt langsam die Gelatine und hat keinen Einfluß auf Gallerte und Stärke. Sein Temperaturoptimum liegt zwischen 25° und 27°. Es produziert ein rotes Pigment, welches in Alkohol, Azeton, Äther, Methylalkohol, Amylalkohol, Schwefelkohlenstoff und Chloroform löslich ist. Die Säuren sind ohne großen Einfluß auf das Pigment. Durch Alkalien wird das Pigment blau.

Penicillium citricolum wächst auf allen den in der Mykologie üblichen Nährsubstraten; sein kulturelles Optimum liegt zwischen 26° und 28°. Es verflüssigt die Gelatine und zersetzt weder den Harnstoff noch Stärke. Es bildet ein gelbes Pigment. Lakon (Tharandt).

Wehmer, C., Über Variabilität und Spezies-Bestimmung. (Mykol. Centralbl. Bd. 2. 1913. p. 195—203.)

Munk hatte vor einiger Zeit ein Penicillium untersucht, das eine sehr charakteristische Koremienbildung zeigt (Mykol. Centralbl. Bd. 1. p. 387). Die Identifizierung mit bereits beschriebenen Arten gelang damals auf Grund der bekannten Merkmale nicht. Wehmer kommt nun auf die Art zurück und beschreibt die Farbe der Pilzdecken. Diese ist oben grün, wie bei anderen Arten, unten aber orangefarben. Indessen tritt diese Färbung oft nicht auf und Verf. stellte deshalb zuerst die Bedingungen fest, unter denen die Färbung auftritt oder nicht. Darüber vergleiche man in der Arbeit. Ganz eigenartig aber ist das Verhalten zu Säure und Alkali. Die orangerote Farbe verschwindet durch Alkali und tritt bei Säurezusatz wieder auf und zwar beliebig oft, so daß der Farbstoff empfindlich wie Lackmus ist. Verf. bespricht dann an der Hand der vorhandenen Artübersichten von Thom und Westling die Einreihung des Pilzes in das System und kommt zu dem Schluß, daß wahrscheinlich eine neue Art, P. varians, vorliegt. G. Lindau (Berlin).

Moreau, F., Sur les zones concentriques que forment dans les cultures les spores de Penicillium glaucum Lk. (Bull. Soc. Bot. France. T. 109. 1912. p. 491—495.)

Wird der Pilz in Kultur genommen, so wechseln auf dem festen Substrate häufig sterile konzentrische Zonen mit fertilen konidientragenden ab. Die Ursache hiervon ist nicht etwa der Wechsel von Tag und Nacht; die Versuchsreihen des Verf. zeigen vielmehr, daß die Erscheinung auf mehreren Faktoren beruht, daß das Licht nur eine bedingte Rolle spielt. Denn es traten in den Kulturen des Verf. Zonenbildungen ein, wenn sowohl die Kulturen ganz und stets im Dunkeln oder ebenso nur im Lichte erzogen wurden. Über den Einfluß des Nährbodens kann man vorläufig noch nichts positiv sagen. Matouschek (Wien).

Grüß, J., Biologie und Kapillaranalyse bei Enzymen. 8°. 227 pp. m. 2 Taf. Berlin (Gebr. Bornträger) 1912. 16 Mk.

Eine wichtige Arbeit. Verf. glaubt, auf Grund früherer Studien annehmen zu müssen, daß mehrere, aber verschiedenartige Enzymwirkungen auf ein und dasselbe Enzym zurückzuführen seien, z. B. sind der Malzdiastase zuzuschreiben: Zellhautlösung, Peroxydasenwirkung, H_2O_2-Zersetzung. Ähnliches gelte für Tyrosinase, Proteasen.

Hierbei glaubt er nicht an die Koexistenz zweier differenter unabhängiger Enzyme, sondern nur an komplexe Enzyme („Enzymsysteme"). Verf. arbeitete eine beachtenswerte kapillar-analytische Methodik für die Enzymuntersuchung aus, aber sie erscheint noch so vorläufig ausgestaltet zu sein, daß sie nicht auf jede Frage eine befriedigende Antwort gibt. Verf. zeigt, daß die Ansicht, isolierte Endosperme entleeren sich, wenn für stete Abfuhr der Lösungsprodukte Sorge getragen, nicht richtig ist, daß vielmehr die Aleuronzellen als Diastase sezernierende Organe in Betracht kommen. Unter „Antioxydase"-Wirkung ist die Hemmung bestimmter Oxydationswirkungen zu verstehen. Dieser fragliche Stoff wird nach Verf. auch von den Aleuronzellen abgeschieden. Peroxydspaltende Enzyme weist Verf. zurück, da er unter „Katalase" nur die Zersetzung des H_2O_2 versteht. Die Oxydase in der Aleuronschicht und Embryo faßt er als selbständiges Enzym auf. Das Gegenenzym der Diastase sei die Amylokoagulase. Invertin läßt sich kapillaranalytisch gut von Diastase trennen. Es folgen kapillar-analytische Untersuchungen über die Enzyme der Kartoffelknolle, Hutpilzenzyme, Hefenenzyme, Milchsäfteenzyme. Mit Lipase erzielte Verf. auf solchem Wege keinen Erfolg. — Auf die vielen Einzelheiten und die Versuchsreihen müssen wir hier nur hinweisen. Interessant und neu ist des Verf. Darstellung der Verteilung der Stoffe im Adsorptionsfelde durch Farbenreaktionen an herausgeschnittenen Sektoren (die sog. „Chromogramm-Methode").

Matouschek (Wien).

Abderhalden, Emil, Schutzfermente des tierischen Organismus. Berlin (Springer) 1912.

Die Grundlage des Werkes bildet der Ausspruch des Verf., daß es Fermente sind, welche den Auf- und Abbau im Stoffwechsel der Pflanzen und

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tiere regulieren. Aus blutfremdem Nahrungseiweiß (Kasein, Pflanzeneiweiß usw.) wird bluteigenes Eiweiß. Auf dem gleichen Wege bauen die einzelnen Körperzellen ihre spezifischen Proteïne auf, da die ihnen eigenen spezifisch wirkenden Fermente den Abbau zu Aminosäuren (aus Plasmaeiweiß) bewirken und andererseits wieder andere Fermente den Aufbau zu zelligerem Eiweiß ausführen. Es gibt daher körperfremde und körpereigene Stoffe. Den Fermenten kommt eine Schutzwirkung zu. Denn sie verhindern, daß z. B. bei der Verdauung Produkte in den Körper übergehen, die etwa den Körperzellen und dem Blute nicht angepaßt wären. Das Gleiche gilt von der Zelle, die gleichsam den ganzen Verdauungsakt wiederholt. Es arbeiten also alle Zellen harmonisch zusammen. Die Darm- und Leberzellen geben keine Stoffe ab an die Blutbahn, die ihrer Eigenart nicht ganz beraubt wären, die Körperzellen insgesamt aber geben nur jene Produkte an die Blutbahn ab, die ihren zelleigenen Typus infolge Abbaues eingebüßt haben. Es ist daher das Blut bezüglich seiner Zusammensetzung konstant. Diese Konstanz und die Harmonie im Organismus wird aber sofort gestört, wenn irgendwo fremdartige Stoffe auftreten. Da können zwei Fälle auftreten:

A. Es treten selbständige fremdartige Zellen mit eigener Struktur und eigenartigem Stoffwechsel auf, z. B. Krebszellen oder Bakterien. Diese besitzen ihre eigenen Fermente, welche den Zellinhalt der Wirtszellen verändern; sie erzeugen auch Stoffwechselprodukte, die für den Organismus des Wirtes ganz unbekannte Abbaustufen sind. Es ist leicht einzusehen, daß dadurch bedeutende Schädigungen im Leben des Wirtes auftreten können, da ja noch dazu diese fremdartigen Zellen innerhalb des Wirtes zerfallen, also wieder andere körperfremde Stoffe in der Zelle und im Blute auftreten. Die Bakterienwirkungen sind daher nicht immer einem von ihnen abgesonderten Toxin zuzuschreiben. Der Wirt kämpft nicht bloß gegen diese Toxine, sondern auch gegen die Stoffwechselzwischenprodukte und die ihm fremden Abbaustufen. Die Schutzfermente des tierischen Organismus sind daher sehr wichtig bei Beurteilung der Immunität.

B. Oder es treten irgendwo Stoffe (Eiweißkörper) auf, die für die Zellen des Organismus organ- bzw. zellfremd sind. Z. B. spritzte Verf. in die Blutbahn des Hundes blutfremdes Eiweiß (Eiereiweiß) ein. Da treten bald im Blute Fermente auf, welche dieses Eiweiß in dem Organismus vertraute Bausteine zerlegen. Das Serum des Tieres zeigt ein diesbezügliches Spaltungsvermögen., So besitzt auch das Blutserum von Schwangeren für Plazentaeiweiß (herrührend von den Chorionzotten) ein starkes Spaltungsvermögen. Das Gleiche gilt für Fette, Zuckerarten, Kohlehydrate und Nukleïnsubstanzen. Die Experimente des Verf. weisen auch darauf hin, daß solche umgebaute Stoffe sogar als Nahrungsstoffe verwertet werden können.

Matouschek (Wien).

Euler, Hans, u. Johansson, David, Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme. VIII. Über die gleichzeitige Veränderung des Gehaltes an Invertase und an Gärungsenzymen in der lebenden Hefe. (Zeitschr. f. physiolog. Chem. Bd. 84. 1913. p. 97.)

Unter bestimmter Vorbehandlung nimmt die enzymatische Inversionswirkung der Hefe zu. Es handelt sich hier aber um keine Anpassung, da es gleichgültig ist, ob die Hefe vorher mit Rohrzucker oder mit Glukose behandelt wird. Auch kann es sich nicht um eine Steigerung der Lebensprozesse in der Hefe handeln, da die Gärkraft gleichzeitig abnimmt. Eine Erklärung des Vorgangs ist noch nicht möglich. H. Strauß (Berlin).

Roger, H., Influence de la bile sur les fermentations microbiennes. I. Fermentation de l'amidon. II. Fermentation du glycogène. III. Fermentation du glucose. (Compt. Rend. Soc. Biolog. Paris. LXXII. 1912. p. 388, 544, 603.)

Es wurde der Einfluß der Rindsgalle auf den Verlauf der Fermentation studiert, die hervorgerufen wurde durch eine Aussaat von Darmbakterien des Menschen auf einem Kulturmedium, das Pepton und diverse Kohlehydrate enthielt. In bezug auf das Amidon, dem behufs Neutralisierung der Säure Kalkkarbonat zugesetzt wurde, ist die Fermentation von starkem Einflusse bei starken Dosen von Galle; sie wird vermindert bei kleinen Dosen. Wird das Pepton unterdrückt, so unterdrückt man das Phänomen der Reinigung; in der Transformation des Amidons tritt dann ein Rückschritt ein. — In bezug auf das Glykogen sind starke Dosen der Galle von geringem Einflusse. Kleinere Dosen (5 per 20 p. 100) vernichten den Einfluß der Fermentation. — Bezüglich der Glykose: Die kleineren Quantitäten von Galle wirken hier kräftiger als die starken Dosen. Die Wirkung ist eine langsamere im bouillon- als im peptonenthaltenden Wasser.

Matouschek (Wien).

Mayer, Paul, Zuckerfreie Gärung bei Stereoisomeren. (Biochem. Zeitschr. Bd. 50. 1913. p. 283.)

Verf. weist nach, daß zuckerfreie Gärungen ebenso wie die Vergärung des Zuckers von sterischen Verschiedenheiten des zu vergärenden Stoffes abhängig sind. Die Oxyfumarsäure zerfällt, ebenso wie es Neuberg für die Oxymaleinsäure dargetan hat, durch alle Hefen in Kohlensäure und Acetaldehyd. Diese Gärung läßt sich auch durch zellfreien Hefemacerationssaft nach v. Lebedew ausführen. Auch das Kaliumsalz ist gärbar. Demnach lassen sich die Oxalessigsäure, die Oxymaleinsäure und die Oxyfumarsäure mit den drei gärenden Hexosen d-Fruktose, d-Glukose und d-Mannose vergleichen. Es bleibt freilich für beide Fälle noch unentschieden, ob die Hefe die unveränderten Formen direkt angreift oder erst umlagert.

Hermann Strauß (Berlin).

Dox, W. Arthur u. Ray, E. Neidig, Enzymatische Spaltung von Hippursäure durch Schimmelpilze. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 68.)

Nachdem schon Shibata gezeigt hat, daß Aspergillus niger Hippursäure spaltet, hat Kossowicz (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 1) eine Reihe von Schimmelpilzen in dieser Richtung geprüft und wirksam gefunden. Verff. haben, um diese Versuche an einer Reihe von Schimmelpilzen bestätigen zu können, die Wirkung quantitativ verfolgt. Über die Resultate im einzelnen unterrichten uns Tabellen im Text.

Hermann Strauß (Berlin).

Panzer, Theodor, Einwirkung von Ammoniakgas auf Invertase. IV. Mitteilung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84. 1913. p. 408.)

Verf. hat seine bisherigen Versuche (diese Zeitschr. Bd. 82. p. 276 u. 377, Bd. 84. p. 161) mit der gleichen Methodik fortgesetzt und gezeigt, daß die Schädigungen der Invertase durch Ammoniakgas erst nach Austreiben des

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Gases deutlich werden. Vielleicht werden die zur Wirkung nötigen Karbooxylgruppen gebunden. Hermann Strauß (Berlin).

Panzer, Theodor, Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas auf Invertase. VI. Mitteilung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 225.)

Im Gegensatz zur Diastase kehrt bei der Invertase nach Inaktivierung durch Chlorwasserstoffgas die Wirksamkeit durch Behandeln mit Ammoniak nicht wieder. Diese Beobachtung spricht für eine Anhydridbildung durch Chlorwasserstoff, wie auch schon für die Diastase eine Salzbildung als unwahrscheinlich bezeichnet wurde. Hermann Strauß (Berlin).

Panzer, Theodor, Einwirkung von Stickoxyd auf Invertase. VIII. Mitteilung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 392.)

Invertase bindet Stickoxyd wahrscheinlich als Nitrosoverbindung. Es verhält sich dabei wesentlich anders als Diastase, was auf chemische Konstitutionsverschiedenheiten hinweist. Hermann Strauß (Berlin).

Panzer, Theodor, Einwirkung von Ammoniakgas auf Diastase. III. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84. 1913. p. 161.)

Im Anschluß an die früheren Versuche mit Chlorwasserstoff (Bd. 82. p. 276 u. 377 dieser Zeitschrift) hat Verf. auf Diastasepräparate Ammoniakgas einwirken lassen. Es zeigte sich, daß die diastatische Kraft eher gesteigert war als vermindert. Da bei einer Behandlung mit Ammoniak Aldehydgruppen das Ammoniak binden würden und alkoholische Hydroxylgruppen durch Aminogruppen ersetzt würden — beide Vorgänge sind durch die Versuche des Verf. wahrscheinlich gemacht worden, so ist bewiesen, daß für die diastatische Wirkung die Anwesenheit einer unveränderten Aldehydgruppe nicht notwendig ist, und ferner wahrscheinlich gemacht, daß auch eine durch Enolbindung an eine alkoholische Hydroxylgruppe gebundene Aldehydgruppe nicht zur diastatischen Wirkung notwendig ist. H. Strauß (Berlin).

Panzer, Theodor, Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas auf Diastase. V. Mitteilung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 97.)

Verf. konnte unter Fortsetzung seiner bisherigen Versuche mit entsprechendem Untersuchungsgang (diese Zeitschr. Bd. 82) zeigen, daß durch Chlorwasserstoffgas unwirksam gemachte Diastase durch Ammoniakgas, nicht aber durch wäßriges Ammoniak, wieder aktiviert wird, wenigstens zum großen Teil. Es scheint sich nicht um eine salzartige Bindung des Chlorwasserstoffs zu handeln. Hermann Strauß (Berlin).

Panzer, Theodor, Einwirkung von Stickoxyd auf Diastase. VII. Mitteilung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 292.)

Verf. hat Diastase mit Stickoxyd behandelt, in der Hoffnung, damit eine doppelte Kohlenstoffbindung nachweisen zu können, etwa im Sinne der Gleichung $-CH=CH- + 2\,NO = -CH.NO-CH.NO$. Es ließ sich bei den Versuchen ein schädigender Einfluß des Stickoxyds auf Diastasepräparate nachweisen, wenn kein Milchzucker zugegen war. Die Art dieses Einflusses ist aber noch nicht geklärt, vielleicht entstehen Nitrosoverbindungen. Hermann Strauß (Berlin).

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Reed, H., Die enzymatische Kraft gewisser Pflanzendiastasen. Vortrag. (Chemiker-Ztg. Bd. 36. 1912. p. 1143.)

Das durch Züchtung gewonnene Mycel des berüchtigten Apfelfäulnispilzes Glomerella rufomaculans beherbergen Enzyme, die wichtige Bestandteile der Äpfel zerstören. Nachgewiesen wurden: Amylase, Invertase, Inulase, Lipase, Protease, Amidase, ein Enzym, das Hippursäure in Glykokoll- und Benzoësäure zerlegt, ein anderes, das auf Arbutin, Amygdalin, und Salicin einwirkt, ferner Cytase. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines Azetonätherextraktes. Doch auch wenn infolge des Pilzes der Apfelmark zersetzt wurde, gewann Verf. Enzyme: Amylase, Invertase, Erepsin, Amidase, oxydierende und produzierende Enzyme. Extrazellular-Emulsion und Zymase fand man nicht. Matouschek (Wien).

Bradley, H. C., Lactase of the Mammary Gland. (Journ. of Biolog. Chemistry. Vol. 13. 1913. p. 431.)

According to the author's experiment there is no lactase present in the mammary gland. It is possible that a proenzym is present, but has not been activated. Addition of animal blood and sugar to the gland "brei" gave negative results, as did also digestion under neutral, slightly acid and slightly alkaline conditions. Some digestion mixtures showed increased reduction, which might be mistaken for hydrolysis of lactose, were it not for the control hydrolysis by acid. In these cases the evidence points to the formation of a reducing disaccharid rather than to the conversion of disaccharids to monosaccharids of greater reducing power. The author assumes that the disaccharid is lactose, developed from some mother substance laid up in the gland cells at the time of death. This mother substance may be analogous to glycogen or a more complex protein-lactose conjugation. The author thinks that the fact that autolysing mammary tissue develops a reducing disaccharid, probably lactose, is strong evidence that lactose is not built up by the enzym lactase in the active gland.

There is further evidence that the production of lactose is not through the agency of lactase. If lactase were present at the moment of secretion it would be discharged from the cells with the milk constituents. If it were present in milk, dextrose and galactose would gradually appear in place of lactose.

From his experiment the author concludes that some doubt is thrown on the theory of enzym synthesis. He thinks it justifiable to conclude that the lactose of milk is not synthesized through the agency of the enzym lactase. P. G. Heinemann (Chicago).

Richet, Ch., Une race de ferment lactique arsénicophile (accoutumée aux fortes doses d'arsenic). (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 1252—1254.)

R. par cultures successives est arrivé à adapter un ferment lactique pur à des milieux renfermant par litre de lait de 0,4 à 32 gr. d'arséniate de potasse neutralisé à la phénolphtaléine. Le ferment adapté à l'arsenic produit de fortes quantités d'acide lactique en 24 heures; par exemple, pour un milieu formé par parties égales de lait et d'eau, additionné d'arséniate, il a obtenu: 107 d'acide lactique pour 0,4 gr. d'arséniate et 253 d'acide pour 16 gr. Le témoin non additionné d'arséniate donnant 100 d'acide lactique. Si on emploie un milieu au lactose, le témoin donnant 100 d'acide lactique, on obtient: pour 0,4 gr. d'arséniate, 100 d'acide lactique; pour 4 gr., 1020 d'acide; pour 16 gr., 1900 d'acide, pour 24 gr., 550 d'acide et pour 32 gr., 70 d'acide. Si l'on repique le ferment habitué à l'arséniate, dans les mêmes milieux, mais qui en sont privés, la fermentation est très faible pour le lait et nulle pour les solutions de lactose. Cette expérience prouve que le ferment accoutumé à l'arsénic, ne peut plus se passer de ce corps pour vivre normalement. L'auteur considère qu'il a ainsi créé une nouvelle race de ferment lactique. Il rapproche cette accoutumance avec des observations de Ehrlich et de ses élèves, de celle des Trypanosomes aux dérivés arsénicaux. H. Kufferath (Bruxelles).

Neuberg, Carl, Weitere Untersuchungen über die biochemische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure nebst Bemerkungen über die Entstehung der verschiedenen Milchsäuren in der Natur. (Biochem. Ztschr. Bd. 51. 1913. p. 484.)

Die Anwesenheit einer sog. Ketonaldehydmutase, welche Methylglyoxal in Milchsäure überführt und sich in tierischen Organen findet, hat Neuberg in obergäriger Hefe (Hefe B des Instituts f. Gärungsgewerbe), sowie im Mazerationssaft aus getrockneter obergäriger Hefe XII nachgewiesen. Hierzu wurde zu der Hefesuspension bzw. zu dem mit Toluol versetzten Mazerationssaft $CaCO_3$ zugesetzt, mit CO_2 gesättigt und Methylglyoxal zugefügt. Nach Aufbewahren bei 35° ließ sich dann die Milchsäure beim Versuch mit lebender Hefe zu 19,5 Proz., beim Versuch mit Mazerationssaft zu 38,4 Proz. der Theorie nachweisen. Die Milchsäure war, wie sie auch Buchner und Meisenheimer bei der zellfreien Zuckergärung (aber nicht bei Gärung mit frischen Reinzuchthefen) auftreten sahen, optisch inaktiv. Hermann Strauß (Berlin).

Lebedew, A. v., 1. Über die Veresterung von Dioxyaceton mit Phosphaten. 2. Über Alkoholgärung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84. 1913. p. 305 u. 308.)

Kurze Besprechung von Prioritätsfragen gegenüber Euler und Kostytschew. H. Strauß (Berlin).

Lutz, L., Sur la présence dans le Gyromitra gigas et la Disciotis perlata de tyrosinase et d'un chromogène. (Bull. Soc. myc. France. T. XXVIII. 1912. p. 136—139.)

Bei Gyromitra gigas und Disciotis perlata konnte Verf. das Vorhandensein von Tyrosinase und einem Chromogen feststellen.

Lakon (Tharandt).

Bokorny, Th., Einwirkung von Eisen-, Mangan-, Zink- und Kadmiumvitriol auf die Vermehrung der Hefe. (Allgem. Brauer- u. Hopfen-Ztg. Bd. 53. 1913. p. 223.)

Kupfervitriol tötet Bierhefe schon bei einer Verdünnung von 0,001 Proz. Das Gärvermögen wird selbst binnen 5 Tagen durch 0,1 Proz. nicht unterdrückt. Ein fördernder Einfluß wurde bei keiner Verdünnung festgestellt. — 0,5 Proz. Eisenvitriol sind tödlich für Bierhefe; wahrscheinlich reichen schon geringere Konzentrationen aus. — 1 Proz. Zinkvitriol unterdrückt das Wachstum mancher Bakterien. 0,25 Proz. wirken noch etwas schädlich auf Hefe, 0,1 Proz. nicht mehr. Reizwirkung ist bei keiner Konzentration zu erkennen. — Kadmiumvitriol ist weit giftiger als Zinkvitriol. 0,025 Proz. wirken noch schädlich auf Bierhefe ein. Auch für Bakterien ist es giftiger als Zinkvitriol. — Manganvitriol ist für Bierhefe fast unschädlich. Erst 3—5 Proz. hindern die Vermehrung. 0,02 Proz. üben Reizwirkung aus. — Kobaltnitrat ist für Hefe sehr giftig; schon 0,01 Proz. hindern die Vermehrung der Bierhefe, aber nicht die Gärung. — 0,5 Proz. Nickelsulfat sind für Hefe tödlich, 0,1 Proz. nicht mehr. H. Will (München).

Zikes, H., Über den Einfluß von Aluminium auf Hefe und Bier. (Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabrikat. 41. 1913. p. 71.)

Verf. schließt zunächst aus seinen Versuchsergebnissen, daß kleine Mengen von Aluminium, wie sie während der Gärung von Würze in Aluminiumgefäßen in jene übergehen und von der Hefe aufgenommen werden, einen gewissen Anreiz auf deren Funktionen ausüben. Nach drei Tagen war das Verhältnis der Vermehrungsenergie in den Aluminiumgefäßen zu derjenigen in Glasgefäßen wie 1 : 0,994. Für eine Million neugebildeter Zellen war die Gärungsenergie der Hefe in den Aluminiumgefäßen 0,748 mg, in Glasgefäßen 0,70 mg. Nach 7 Tagen war das Vermehrungsverhältnis 1 : 0,975, die Gärfähigkeit 0,942 mg bzw. 0,926 mg. Im Endvergärungsgrad machte sich eine Reizwirkung des Aluminiums auf die Hefe nicht bemerkbar. Die Generationsdauer von Hefe in Würze, welche sechs Stunden in Aluminiumbechern erhitzt war, betrug durchschnittlich 2 h 29' 29" gegenüber 1 h 34" 30" in Würze, welche in Glasgefäßen erhitzt war. Die Generationsdauer beanspruchte in ersterem Falle eine um 30—35 Minuten längere Zeit. Man kann dabei nur daran denken, daß durch das längere Kochen eine größere Menge Aluminium (vielleicht durch das im Aluminium enthaltene Arsen) gelöst wurde. Ähnliche Versuche in Eisen-, Kupfer- und verzinnten Kupfergefäßen ergaben eine kürzere Generationsdauer der Hefe als in Aluminiumgefäßen.

H. Will.

Bokorny, Th., Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Gärkraft. (Allg. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 53. 1913. p. 941—943, 957—959, 973—975.)

Verf. untersuchte die Einwirkung zahlreicher chemischer Stoffe auf den Gärungsvorgang, im besonderen suchte er die Grenze festzustellen, bei welcher die Zymase durch chemische Stoffe dauernd vernichtet wird. Untersucht wurde die Einwirkung von Säuren, Basen, Salzen, Oxydationsgiften, Aldehyden, Ketonen. 2 Proz. Kaliumkarbonat hindern die Gärung, 5 Proz. Dinatriumphosphat machen die Zymase unwirksam, desgl. 1 Proz. Ätzkali und Ammoniak. Das Ammoniak gehört zu den Basen, welche eine stärkere Giftwirkung äußern, als ihnen nach ihrer Basizität zukommen würde. Die Zymase hält 1—5 Proz. Schwefelsäure 15 Stunden lang aus, von Salzsäure wird sie bei 1 Proz. geschädigt. Bei Zusatz von 0,1 Proz. Flußsäure trat binnen 24 Stunden Gärung nicht ein, die Hefe wurde aber nach Entfernung des Giftes wieder gärfähig, bei 0,2 Proz. war die Zymase abgetötet. 5-proz. Milchsäure und Buttersäure hat die Gärkraft nach 24 Stunden noch nicht völlig vernichtet; erst 2-proz. Oxalsäure macht sie unwirksam. 1-proz. Ameisensäure zerstört die Gärkraft innerhalb 24 Stunden fast vollständig, 5-proz. Essigsäure vollständig. Verf. hat außerdem Versuche mit Neutralsalzen in 10-proz. Lösung angestellt. In keinem Falle war die Vermehrung ganz ausgeblieben, die Gärkraft war überall vorhanden. Beim Zerreiben von trockener

Hefe mit Salzen war meistens die Gärfähigkeit vernichtet. Durch 5 Proz. Kupfersulfat wird die Zymase sogleich zerstört. Schon 0,5 Proz. reichen aus, um die Zymase auf immer unwirksam zu machen. Weder 2 Proz. noch 5 Proz. Zink- und Kadmiumsulfat sind imstande, die Gärkraft innerhalb 24 Stunden zu vernichten. 5 Proz. Eisenvitriol vermögen die Gärkraft binnen 24 Stunden nicht zu zerstören. Nach Behandlung der Hefe mit 1 Proz. Kaliumchlorat trat Gärung ein; 1 Proz. Natriumbisulfat vermag die Gärkraft nicht zu vernichten. 50-proz. Äthylalkohol tötet die Zymase nicht in 24 Stunden, jedoch 50-proz. Methylalkohol. Bei 20-proz. Methylalkohol trat nach 24 Stunden noch Gärung auf. Propylalkohol unterdrückte die Gärkraft, bei Amylalkohol reichen 5 Proz. aus, bei Methylalkohol dagegen 20 Proz. noch nicht vollständig. 0,1 Proz. Formaldehyd sind für die Zymase nicht schädlich, durch 5 Proz. wird die Zymase rasch vernichtet. H. Will.

Dreyer, G., Beiträge zur Chemie der Hefe. I. Über die Natur der Zellmembran. II. Untersuchungen über das Hefeneiweiß. (Ztschr. f. d. ges. Brauwes. Bd. 36. 1913. p. 201.)

I. Die Hefenmembran ist zu den Hemizellulosen zu rechnen, und zwar kann sie als Mannodextran bezeichnet werden. Das aus der Hefe durch Kochen mit Wasser oder Behandlung mit Alkalien erhältliche Gummi ist wahrscheinlich in der Zellwand der lebenden Hefe nicht präformiert; es wird wohl vielmehr durch das Kochen mit Wasser bzw. die Behandlung mit Laugen erst aus dem größeren Komplex der eigentlichen Hemizellulose abgespalten. Der Körper, welcher aus einer von Gummi und Eiweiß befreiten Hefe durch Kochen unter Druck nach den Angaben von Salkowski erhalten werden kann, ist kein am Aufbau der Membran beteiligtes Kohlenhydrat, sondern entweder Glykogen selbst oder doch eine dem Glykogen sehr nahestehende Substanz. Zu Diastase verhält sich der Körper ganz wie Glykogen. Auf jeden Fall wird er gleich diesem bei der Selbstgärung und Selbstverdauung der Hefe hydrolysiert und ist deshalb in solchen Membranen, welche durch Autodigestion von Hefe gewonnen wurden nur noch in Spuren vorhanden, während er in frisch abgetöteter, gut ernährter untergäriger Hefe in beträchtlichen Mengen vorkommt. Die durch Selbstverdauung von Hefe gewonnenen Membranen machen ca. 19 Proz. der Hefentrockensubstanz aus.

II. Aus frischer Preßhefe kann durch Behandlung mit Ammoniak, Ammonkarbonat oder Soda koagulierbares Eiweiß gewonnen werden, und zwar im günstigsten Falle 12 Proz. der Trockensubstanz. Da der Stickstoffgehalt des Koagulums in diesem Fall 23,4 Proz. vom Gesamtstickstoff der Hefe beträgt, so muß man wohl annehmen, daß dieses Eiweiß, wenigstens zum größeren Teil, aus dem plasmatischen Inhalt stammt und vielleicht durch Stellen der Membran, die für Eiweißlösungen durchlässig sind, ausgetreten ist. Das auf diese Weise gewonnene Eiweiß ist kein einheitlicher Körper, sondern er besteht aus zwei Substanzen, die nach ihren Eigenschaften als Globulin und Albumin anzusprechen sind. Von dem extrahierbaren Eiweiß entfallen 40 Proz. auf das Globulin und 60 Proz. auf das Albumin. H. Will.

Lebedew, A. v., Über den Mechanismus der alkoholischen Gärung. (Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 46. 1913. p. 850.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Gegen die Ansprüche Kostytschews (Bd. 46. 339) bemerkt Verf., daß 1. sein Schema der Gärung unter Berücksichtigung der Arbeiten Neubauers und Neubergs, die Brenztraubensäure und Acetaldehyd als Zwischenprodukt der Gärung ansehen, aber unabhängig von Kostytschew entstanden sei und daß 2. die Angaben Kostytschews über die Acetaldehydbildung bei seinen Versuchen, sowie die Annahme einer Reduktion des Acetaldehyds recht zweifelhaft sind. H. Strauß (Berlin).

Kostytschew, S., Über Alkoholgärung. IV. Mitteilung. Über Zuckerspaltung durch Dauerhefe in Gegenwart von Zinkchlorid von **S. Kostytschew** und **A. Scheloumoff.** (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 493.)

Durch Zufügen von Zn Cl_2 zu dem Gärgemisch (Hefenol) wird zunächst die vollständige Vergärung des Zuckers zu Alkohol und CO_2 zum großen Teil gehemmt und weiterhin auch das Verhältnis CO_2 : Alkohol verändert, was einen neuen Beweis für den stufenweisen Ablauf der Gärung bringt. Die Energie der Gärung wird stark herabgesetzt. Der Acetaldehyd wurde als Zwischenprodukt nachgewiesen.

V. Mitteilung. Über Eiweißspaltung durch Dauerhefe in Gegenwart von Zinkchlorid von Kostytschew, S. und Brilliant, W. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 507).

Zinkchlorid beeinflußt die Eiweißspaltung durch Hefe nicht direkt, während sonst alle Einflüsse, die die Zuckerspaltungen hemmen, die Eiweißspaltung steigern. Daraus geht hervor, daß die Wirkung des Zinkchlorids auf die Zuckerspaltung eine direkte Einwirkung auf das Ferment bedeutet und nicht etwa auf Steigerung der Eiweißspaltung beruht.

Hermann Strauß (Berlin).

Beijerinck, M., Über die Selbstgärung bei der Alkoholhefe. (Extr. du Livre Jubilaire van Laer. 1913. p. 128—136.)

Die Erscheinung, daß Hefe, die sich selbst überlassen ist (mit oder ohne Wasser) eine gewisse Menge Alkohol und Kohlensäure entwickelt, war schon Liebig bekannt und wurde 1860 von Pasteur untersucht. Neuerdings nimmt man allgemein an, daß das von Errera 1882 in der Pilzzelle entdeckte Glykogen dabei angegriffen wird und der Menge des gebildeten Alkohols entsprechend verschwindet, indem das Enzym Glykogenase aus dem Glykogen Zucker, wahrscheinlich Glykose, vielleicht auch ein weiteres Enzym Maltoglukose Maltose erzeugt, welcher Zucker dann weiter vergoren wird. Schizosaccharomyces pombe bildet kein Glykogen und zeigt dementsprechend auch keine Selbstgärung.

Verf. ist durch nähere Untersuchung des Vorganges der Selbstgärung zu dem Schluß gekommen, daß es eine Reihe von Bedingungen gibt, die dieselbe auslösen können, nämlich 1. erhöhte Temperatur, 2. lösliche Körper, die den osmotischen Druck erhöhen, 3. Eintrocknen, 4. Gifte und Desinfektionsmittel, wie Sublimat, Jod, Jodoform, Chloroform, Phenol, Kresol, Toluol, Säuren und Alkalien. Es tritt also Selbstgärung der Alkoholhefe in allen Fällen ein, wo schädliche Einflüsse, die die Existenz der Hefeart bedrohen, einwirken und dürfte die biologische oder ökologische Bedeutung haben, Insekten anzulocken, die dieselbe auf günstigeren Nährboden verschleppen. Daß diese Auffassung zutrifft, ergibt eine Beobachtung der Insekten, z. B. der Wespen an den beiden natürlichen Fundorten der Alkoholhefen, den Weintrauben

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

und Baumflüssen. Die Wespen, Hornissen usw. werden durch Alkohol angezogen und gehen andererseits an gesunde Weintrauben, die sie zerbeißen, um den Zuckersaft zu lecken; die ganze Flora des gärenden Saftes (Apiculatushefe, Milchsäurefermente, Essigbakterien, Amöben, Mucor racemosus, Kahmpilze, wozu dann in den Weinbergen die Weinhefen, in südlichen Ländern — auf Korinthen, Datteln, Feigen — noch Schizosaccharomyces octosporus u. Sch. pombe kommen) wird so durch Tiere verbreitet. Gleiches gilt auch vom Schleimfluß gärender Bäume, der zweiten natürlichen und sehr ergiebigen Quelle für das Auffinden spontaner Alkoholhefen. Darin finden sich jedoch noch einige besondere Bewohner, die auf Süßfrüchten fehlen, namlich Endomyces Magnusii, Saccharomycodes Ludwigii usw., sowie der Gattungen Prototheca und Chlorella. Auch hier wird durch Insekten, die dem Alkohol nachgehen (Referent erinnert auch an die Nektarhefen der Blumennektarien) die Pilzflora von Baum zu Baum verbreitet, auch nachdem der Pilzschleim schon eingetrocknet ist, wo also die Selbstgärung der Hefe in Wirkung tritt. Ludwig (Greiz).

Jannin, L. et Vernier, P., A propos des genres Zymonema et Mycoderma. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 1134—1136.)

J. et V. décrivent un Mycoderma isolé de crachats, ils constatent que ce Champignon présente des formes identiques à celles de Zymonema. Ils concluent à la suppression du genre Zymonema qui ne serait qu'une forme de Mycoderma. H. Kufferath (Bruxelles).

Kostytschew, S. u. Hübbenet, E., Zur Frage der Reduktion von Acetaldehyd durch Hefesaft. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 408.)

Genauere Bestimmungen konnten die schon früher gemachte Beobachtung bestätigen, daß Acetaldehyd bei und ohne Gegenwart von Zucker durch Hefemacerationssaft zu Äthylalkohol reduziert wird. Die Alkoholbestimmungen wurden durch Titration mit Chromsäure in schwefelsaurer Lösung nach Nicloux ausgeführt, der nicht reduzierte Überschuß von Acetaldehyd in Bisulfitverbindung übergeführt. Hermann Strauß (Berlin).

Neuberg, C. u. Rosenthal, P., Über zuckerfreie Hefegärungen. XI. Mitteilung. Weiteres zur Kenntnis der Karboxylase. (Biochem. Zeitschr. Bd. 50. 1913. p. 128.)

Vergleichende Versuche mit Zymase und Karboxylase zeigten erhebliche Unterschiede der beiden Fermente. Karboxylase ist gegen Hitze und Antiseptica viel beständiger als Zymase und wirkt oft noch, wenn die Zymase bereits inaktiv ist. Ferner ist ihre Wirkung auf die Bildung von CO_2 aus Brenztraubensäure viel rascher als die Vergärung von Zucker. Es ist dies ein neuer Beweis für die Annahme, daß der Abbau des Zuckers bei der alkoholischen Gärung in verschiedenen Phasen oder Stufenreaktionen vor sich geht, so daß der Abbau von C_6 zu C_3 gestört sein kann, während der Abbau von C_3 ungehindert funktioniert. Hermann Strauß (Berlin).

Söhngen, N. L., Einfluß einiger Kolloide auf die Alkoholgärung. (Folia Microbiolog. Jg. II. 1913. H. 1.)

Alkalisalze der Humussäuren wirken schädigend auf den Prozeß der

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Alkoholgärung. Kolloidales Eisen-, Aluminium-, Siliciumoxyd und Humussäure verhalten sich indifferent. Biokolloide, wie Torf, Filtrierpapier, Blutkohle und Gartenerde wirken beschleunigend auf den Prozeß der Alkoholgärung. Die Gärungsfunktion, die Aktivität der Hefezelle wird in dem Kulturmedium folgender Zusammensetzung 5 g Glukose, 5 g Preßhefe, 50 ccm Wasser bei Anwesenheit der genannten Kolloide um 50 Proz. gesteigert. Das Wachstum der Hefe, in einem mit wenig Hefe geimpften Kulturmedium, 3—70 Proz. Glukose in Hefenwasser wird ebenfalls um etwa 50 Proz. erhöht. Der günstige Einfluß dieser Kolloide auf den Prozeß der Alkoholgärung ist der niedrigeren Kohlensäurekonzentration in der Kulturflüssigkeit zuzuschreiben. Infolge eines schnellen Entweichens daraus durch Bläschenbildung wird das Kulturmedium nicht mit Kohlensäure übersättigt. Das Freiwerden der Kohlensäure aus damit übersättigten Lösungen durch Biokolloide erklärt sich der Verf. durch Adsorption der Kohlensäurebläschen an den in der Flüssigkeit befindlichen Kolloiden. Es setzen sich an diesen die Kohlensäurebläschen an, steigen an die Oberfläche und entweichen schließlich. Eingeleitet wird die Bildung der Kohlensäureblasen durch die Oberflächenspannung.

Wedemann (Berlin-Lichterfelde).

Will, H., Beobachtungen an den Kristallen in Bierhefen und in Faßgelägern. (Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Bd. 36. p. 253—258; 269—273; 285—289.)

Als Verf. im Jahre 1890 umfassende Studien über die in untergärigen Bierhefen und in Faßgelägern vorkommenden Kristalle und deren Verhalten gegenüber verschiedenen Reagentien anstellte, erhielt er einmal auch eine Hefe mit sehr vielen Kristallen, deren Formen bei der Mehrzahl von den gewohnten abwichen. Neben Quadratoktaedern traten hauptsächlich flache Prismen auf. Diese Kristalle erschienen teils isoliert, teils zu zweien gekreuzt, öfter auch zu Drusen vereinigt. Wahrscheinlich gehörten sie dem monoklinen System an. Nähere Auskunft darüber, zur Herstellung welcher Biersorte die Hefe verwendet worden war, konnte nicht erhalten werden.

Schon damals wurden die Kristalle mikrochemisch untersucht und zeigten dabei manche Abweichungen von dem Verhalten der gewöhnlich vorhandenen (Quadratoktaeder, tetragonale Prismen mit aufgesetzten Pyramiden), welche aus oxalsaurem Kalk bestehen. Vor allem war es das Verhalten gegenüber konzentrierter Essigsäure, welches nicht auf oxalsauren Kalk schließen ließ.

Im Jahre 1910 erhielt Verf. wieder eine Hefe mit sehr zahlreichen Kristallen, und zwar flachen Prismen, wie sie schon 1890 beobachtet worden waren. Die Hefe hatte Starkbierwürze vergoren.

Diese Beobachtungen veranlaßten den Verf. heuer seine früheren Untersuchungen an den den untergärigen Bierhefen und dem Faßgeläger beigemengten Kristallen, deren Ergebnisse er in seiner Anleitung zur biologischen Untersuchung usw., p. 16, niedergelegt hat, zu revidieren und hierzu hauptsächlich auch Faßgeläger von Starkbierhefen zu verwenden.

Die erste Starkbierhefe, welche zur Untersuchung kam, zeigte in Beziehung auf die beigemengten Kristallformen wieder den gleichen Charakter wie die früher erhaltene. Neu und unerwartet war die Beobachtung, daß sich die flachen Prismen in 10proz. Kalilauge lösten. Nach den bisherigen Anschauungen konnte also, auch im Zusammenhalt mit dem Verhalten der Kristalle gegenüber konzentrierter Essigsäure, oxalsaurer Kalk nicht vorliegen.

Vier Punkte waren es, welche die Aufmerksamkeit bei der Untersuchung von Starkbierhefen bis dahin auf sich gelenkt hatten.

1. Die große Zahl der Kristalle überhaupt.

2. Die abweichenden Kristallformen und die große Anzahl der Kristalle mit abweichender Form (vorherrschend flache Prismen).

3. Die Löslichkeit dieser Kristalle in Kalilauge.

4. Erscheinungen, welche auf eine, wenn auch nur schwere Löslichkeit dieser Kristalle in konzentrierter Essigsäure und beim Kochen in Wasser hinwiesen.

Das mikro- und makrochemische Verhalten der Kristalle stand bei der wiederholten Bearbeitung der Frage zunächst im Vordergrund. Es mußte entschieden werden, ob die in Kalilauge und in Essigsäure löslichen Kristalle oxalsaurer Kalk sind oder nicht. Dann kam die Frage in Betracht, ob bestimmte Kristallformen die Hefe und die Faßgeläger von Starkbieren charakterisieren, ferner, ob alle Starkbierhefen und -Geläger sich gegenüber den gewöhnlichen Bierhefen und Faßgelägern durch die größere, ihnen beigemengte Zahl von Kristallen auszeichnen.

Die Hauptergebnisse der neuen Untersuchungen, welche zum Teil an Kristallen verschiedener Art von reinem oxalsaurem Kalk durchgeführt wurden, sind folgende:

1. Die in Bierhefen und Faßgelägern jeder Art vorkommenden Kristalle bestehen in der Hauptsache aus oxalsaurem Kalk.

2. Für Starkbierhefen und -Faßgeläger sind besondere Kristallformen des oxalsauren Kalkes nicht charakteristisch.

3. Im allgemeinen scheint mit Zunahme der Konzentration der Stammwürze des Bieres auch die Zahl der Kristalle in der Hefe und im Faßgeläger zuzunehmen.

4. Alle Kristallformen des oxalsauren Kalkes sind in 10proz., noch leichter in 20proz. Kalilauge löslich. Wesentliche Unterschiede in der Löslichkeit der verschiedenen Kristallformen bestehen nicht. Die kleinen Kristalle sind leichter löslich als die großen.

5. Als sichtbares Produkt der Reaktion zwischen Kalilauge und oxalsaurem Kalk erschienen sechsseitige, in der Regel dünne Täfelchen von zuweilen recht bedeutendem Umfang.

6. Der oxalsaure Kalk ist in konzentrierter Essigsäure mikrochemisch löslich. Die Löslichkeit der verschiedenen Formen, in welcher der oxalsaure Kalk kristallisiert, ist abgestuft. Die bei kalter Fällung erhaltenen Kristalle sind leichter löslich als die bei heißer Fällung erhaltenen.

7. Durch destilliertes Wasser werden die Kristalle des oxalsauren Kalkes in Hefen und Faßgelägern gelöst. Die Löslichkeit ist sehr wahrscheinlich keine direkte, sondern eine indirekte, bedingt durch die verschiedenen Beimengungen. Autoreferat.

Euler, Hans u. **Cassel, Henry,** Über Katalysatoren der alkoholischen Gärung. Vorläuf. Mitteil. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 86. 1913. p. 122.)

Verf. haben beobachtet, daß Salze organischer Säuren, besonders solche der Ameisensäurereihe und von Oxysäuren, die alkoholische Gärung stärker katalytisch beschleunigen als die bisher bekannten Katalysatoren (Phosphate, Schwermetallsalze, antiseptische Mittel in sehr kleinen Mengen usw.). Einige Versuche zur Beschleunigung der Vergärung von Glukose und Rohr-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

zucker durch Hefe mittels Ammoniumformiat werden zur Demonstration der quantitativen Verhältnisse vorläufig mitgeteilt.

Hermann Strauß (Berlin).

Guilliermond, A., Les Levures. Préface de **E. Roux.** 8°. 565 pp. Paris (O. Doin) 1912.

Das Werk zerfällt in zwei nahezu gleiche Teile. Der erste beschäftigt sich mit: Definition, Morphologie, Entwicklung, Cytologie, Physiologie, Ursprung und Verwandtschaft der Hefen, Kultur, Technik, Isolierung, Veränderung der Art, Klassifikation. Der zweite ist systematischer Art. Die Hefen teilt Verf. ein in Saccharomyceten und die Nicht-Saccharomyceten. Die ersteren teilt er ein in folgende fünf Gruppen:

1. Schizosaccharomyces; 2. Zygosaccharomyces, Debaryomyces, Schwaniomyces, Torulaspora, Saccharomycodes; 3. Saccharomycopsis, Saccharomyces (mit 3 Untergruppen); 4. Pichia, Willia; 5. Monospora, Nematospora.

Die zweiten (zweifelhafte Hefen) teilt er in drei empirische Gruppen:

I. Genus Torula (ohne Beziehung zum Genus von Link-Persoon), II. Genus Mycoderma (mit Persoons Gattung übereinstimmend), III. pathogene Hefen unbekannter Verwandtschaft.

In einem besonderen Abschnitte behandelt er die mit den Hefen verwandten Pilze: Endomyces, Monilia, Pseudomonilia.

Der Stoff ist klar angeordnet. Ein Register erleichtert das Aufsuchen der Arten und Rassen. Es ist dem Verf. gelungen, den großen Stoff so zurechtzulegen, daß sowohl der Botaniker, als auch der Praktiker ihn gern lesen und benützen werden. Matouschek (Wien).

Rubner, Max, Über die Nahrungsaufnahme bei der Hefezelle. (Sitzungsber. d. kgl. preuß. Akad. d. Wiss. Berlin. 1913. p. 232—241.)

Ist es möglich, zu einem Resultate zu gelangen, das uns über die Bedingungen der Resorption im einzelnen näher unterrichtet? Ja, und zwar bei einzelligen Wesen. Verf. wählte die Hefe, da er früher über den Stoff- und Kraftwechsel, das Wachstum, die Rolle der Fermente usw. neue Daten mitgeteilt hat. Die Größe der Resorption läßt sich auf zwei Wegen prüfen: Durch den Verlust der Nährlösung an Stoffen (unter Beachtung der Veränderung der Zusammensetzung der Zellen) oder durch den Umsatz der resorbierten Stoffe. Die Gärungsintensität ist in weiten Grenzen von den Konzentrationen des Zuckers absolut unabhängig. Normal geht immer nur soviel Zucker in die Zelle, als gerade für die Lebensleistungen erfordert wird. Die lebende Substanz zeigt durch diese Erscheinung, die Verf. „Selbstregulation" nennt, daß sie es ist, die den Nahrungsstrom reguliert (nicht etwa rein physikalische Verhältnisse). Die Resorption durch die Organzellen ist ein von der Resorption durch die Zellen des Verdauungstraktes ganz verschiedener Vorgang. Zerreibt man Hefe und untersucht den Brei auf sein Gärungsvermögen, so ist letzteres viel kleiner, da nicht alle Hefezellen zertrümmert sind. Verf. fand, daß die lebende oder durch Toluol getötete Hefe sehr rasch auch ohne Gärung einer Lösung von Zucker letzteren entzieht. Nach längerem Liegen in Zucker (über 2 Stunden) findet eine weitere Aufnahme von Zucker statt. Bei 100° getötete Hefe nahm keinen Zucker auf. Versuche bei 2° mit lebender Hefe ergaben Aufnahme des Zuckers. Dieser Prozeß ist also eine Adsorption. Man könnte vermuten, daß durch

Adsorption von Zucker etwas Wärme frei wird. Experimente des Verfassers aber zeigten bei der durch Toluol getöteten Hefe eine Wärmebindung. Die Lösung dieser auffälligen Erscheinung beruht darauf, daß die Hefezellen mitunter viel Glykogen enthalten (Errera, Bywaters). Über die fermentative Natur der Glykogenbildung ist kein Zweifel; sie erfolgt unter Wärmebindung und diese ist von solcher Größenordnung wie die thermische Veränderung, die Verf. bei Mischung von toluolisierter Hefe und Traubenzucker gefunden hat. Dies ist der erste Fall, bei dem die synthetisierende Wirkung eines Ferments direkt thermisch nachzuweisen ist. Die Resorption wird auch bei der N-Nahrung (z. B. Pepton) durch eine Adsorption unterstützt; nur bei wachsender Hefezelle tritt reichlich N-Material durch die Zellwand ein. Auch wenn die Hefe wächst, bestimmt die Masse des Protoplasmas (und nicht die relative Oberfläche) den Durchtritt des Nährmaterials durch die Zellwand. Die Größe der Resorption ist ganz mit der Intensität der Lebensvorgänge verbunden; sie nimmt mit den Schwankungen der Temperatur zu und ab. Durch Zusatz von Alkohol oder Kochsalz zur Hefe wird das Plasma derselben benachteiligt, es wird weniger leistungsfähig und im selben Maße sinkt auch der Durchtritt des Zuckers durch die Zellwand. Bei Beseitigung der schädigenden Stoffe tritt die frühere Leistungsfähigkeit wieder ein. Die Hefe gehört nach den Bestimmungen des Verf. zu jenen Organismen, welche die höchsten bisher bekannten Energieumsätze für die Einheit der Masse besitzen. Mit Rücksicht auf die Angaben von Nägeli läßt sich die Leistung der Hefezellwand für die Resorption genau angeben: Auf 1 qm Oberfläche treffen in 24 Stunden:

	bei 30°	bei 38°
Eiweißaufnahme . .	0,65 g	0,948 g
Zuckerumsatz. . . .	5,59 g	8, 38 g

Die Adsorption macht für den Zucker 0,09 g pro 1 qm bei 30° aus (die nötige Nahrung für 24 Minuten). Die Oberflächenentwicklung ist also sehr bedeutend, wird aber von den Bakterien übertroffen.

Matouschek (Wien).

Vandevelde, A. J. J. u. **Vanderstricht, A.,** Über Invertasereaktion bei gemischten Hefekulturen. (Biochem. Zeitschr. Bd. 51. 1913. p. 388.)

Es wurden Versuche über die Beeinflussung der Inversion des Rohrzuckers mit Mischkulturen folgender Hefearten angestellt: obergärig: Frohberg und Logos; untergärig: zwei Carlsbergarten I und II und Saar. Die Einzelresultate sind aus Tabellen zu ersehen. Im ganzen konnte im Gegensatz zur alkoholischen Gärung keine Begünstigung der Inversion durch Mischkulturen festgestellt werden. Hermann Strauß (Berlin).

Anonyme, Une Bactérie du filage. (Le Petit Journ. du Brasseur. 1913. p. 295—298.)

Courte étude relative à l'Ascobacterium luteum produisant le filage de la bière. H. Kufferath (Bruxelles).

Bekaert, E., L'habitat du ferment de la tourne. (Le Petit Journ. du Brasseur. 1913. p. 371—373.)

Conseils pratiques pour se débarasser de la tourne de la bière.

Kufferath (Bruxelles).

Will, H., Einfluß der Konzentration der Würze auf die Entwicklung von Organismen bei der biologischen Untersuchung von Brauwasser. (Mitteilungen der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Bd. 36. 1913. p. 157—159, 165—167.)

Die Widerstandsfähigkeit der Würze gegen die Zerstörung durch eingeimpfte Wasserorganismen, ihre antiseptische Kraft, wird in der Hauptsache von der Menge der gelösten Hopfenbestandteile, in erster Linie der Weichharze, reguliert. Bei gleicher Hopfengabe kann aber je nach dem bei der Hopfenausnutzung eingehaltenen Verfahren die Menge und die Qualität der gelösten Hopfenbestandteile nach Qualität und Alter des Hopfens verschieden sein. Es müßte also, wenn streng vergleichbare Ergebnisse bei der biologischen Wasseruntersuchung erzielt werden sollen, nicht nur eine Würze von gleicher Konzentration, bemessen nach der Menge und Beschaffenheit des Extraktes überhaupt, sondern in erster Linie eine Würze mit gleichem Gehalt an antiseptischen Stoffen benutzt werden. Dies erscheint aber, wie die Verhältnisse liegen, ausgeschlossen. Bei dem Wichmannschen Verfahren zur Feststellung des Vermehrungsvermögens wird durch den verschieden großen Wasserzusatz zu einer abgemessenen Menge von Würze diese, wenn auch nur in geringem Grade, verdünnt, und damit ihre Widerstandsfähigkeit gegen die Wasserorganismen herabgesetzt, während ursprünglich nur die Wirkung der Zahl der Keime in der zugesetzten Wassermenge und die Energie, mit welcher jene Würze und Bier angreifen, festgestellt werden sollte. Die Entwicklung der Organismen kann durch die Verdünnung der Würze beschleunigt und damit die Höhe des Zerstörungsvermögens bei der Berechnung beeinflußt werden. Für genauere Brauwasseruntersuchungen wurde noch der Vorschlag gemacht, Versuche über das Verhalten von Wasser gegenüber unverdünnter und mit der Hälfte ihres Volumens mit sterilem Wasser verdünnter, gehopfter Würze anzustellen. Dem Verhalten der Wasserorganismen gegenüber verdünnter Würze und gegenüber verdünntem Bier ist jedoch nicht so großes Gewicht beizulegen, wie dem Verhalten gegenüber der Würze von gewöhnlicher Konzentration. Diese auf Grund allgemeiner Erwägungen gewonnene Anschauung entbehrte der experimentellen Unterlage. Deshalb hat der Verf. einige orientierende Versuche unternommen. 35 Brauereiwasserproben wurden außer nach dem an der Wissenschaftlichen Station jetzt eingehaltenen Verfahren gleichzeitig noch in der Weise geprüft, daß jedesmal 30 mit je 10 ccm Würze gefüllte Kölbchen in der gleichen Weise wie bei der allgemeinen Untersuchung mit je einem Tropfen Wasser geimpft wurden. Von den 30 Kölbchen enthielten immer je fünf Würze von gleicher Konzentration, und zwar blieb die Würze von 11,5 Proz. B. einmal unverdünnt, im übrigen war sie im Verhältnis von 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7 und 1 : 9 mit Brunnenwasser verdünnt worden. Bei sechs Wasserproben machte sich ein Einfluß der Verdünnung nicht geltend. Die Wasserproben waren sehr reich an Organismen. In diesem Falle besteht aber die beste Übereinstimmung zwischen dem Zerstörungsvermögen und der Entwicklungsenergie bzw. der Entwicklungskraft. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in zwei Tabellen zusammengefaßt. Jene zeigen, daß durch die Verdünnung der Würze die Entwicklungsmöglichkeit und -Schnelligkeit der in einem gegebenen Wasser vorhandenen Organismen gesteigert werden kann. Wenn auch diese Beschleunigung keine allzu große zu sein scheint, so stellt sie doch bei der biologischen Wasseruntersuchung nach dem

Verfahren von Wichmann eine Fehlerquelle dar, welche vermieden werden kann und soll. Gewisse Erscheinungen bei verdünnter Würze geben einen Fingerzeig, wie im besonderen bei keimärmerem Wasser die so häufig beobachtete Unstimmigkeit zwischen dem Verfahren von Hansen und dem Verfahren von Wichmann zustande kommt. Die Untersuchungen geben ferner einen Fingerzeig dafür, daß zwar infolge der Verdünnung der Würze, wie sie beispielsweise bei mangelhaftem Ausspülen von Leitungen und Geräten entsteht, bei keimarmem Wasser sich gewisse Organismen sehr rasch und stark zu vermehren vermögen, daß diesen aber keine allzu große Bedeutung für den Brauereibetrieb zukommt, weil sie sich in Würze von gewöhnlicher Konzentration entweder überhaupt nicht oder nur in geringem Maße zu vermehren vermögen. Autoreferat.

Collard Bovy et **Lust,** Dr. **E.,** Désidérata formulés pour la fourniture du lait aux gouttes de lait, aux consultations de puériculture, aux crèches, aux ponponnières et autres oeuvres de protection du premier âge. (Bull. de la Commiss. perman. du Lait. T. 3. 1913. p. 1- 3.)

Prescriptions hygiéniques du traitement du lait destiné aux enfants. Ces prescriptions tendent à faire réaliser par les laitiers les améliorations voulues, permettant d'obtenir un lait pur et sain par l'application des connaissances bactériologiques à la pratique journalière.

Kufferath (Bruxelles).

Collard Bovy, Comment doit être organisée l'inspection du lait spécialement dans les grandes villes. (L'industrie laitière belge. Année 12. 1913. p. 28—30.)

Désidérata pratiques en rapport avec les nécessités urbaines. Esquisse d'un contrôle du lait. Kufferath (Bruxelles).

Meinert, C., Hygienisch einwandfreie Milch. (Berl. Molkereizeitg. Jahrg. 23. 1913. p. 85, 97; Der Kuhstall. Jahrg. 1913. p. 85 u. 97.)

„Hygienisch einwandfreie Milch ist solche Milch, welche von gesunden Kühen stammt, die auf Weide oder in gesunden Stallungen gehalten, gut gepflegt und normal gefüttert und von gesunden und reinlichen Melkern (bzw. durch Maschinen) unter Benutzung sauberer Geräte und bei Beobachtung genügender Maßregeln gegen Verschmutzung gemolken werden, und des weiteren so behandelt wird, daß sie ohne wahrnehmbare Veränderung dem Verbraucher im selben Zustand überliefert wird, wie sie aus dem Euter der Kuh gewonnen wurde."

Nach dieser Definition sind im weiteren die Maßregeln dargetan, wie man derartige hygienisch einwandsfreie Milch gewinnt, in bezug auf Stall, Fütterungsvorrichtung, Tränkvorrichtung, Stände, Dungbehandlung, allgemeine Stallreinigung usw.; es ist dann in besonderen Kapiteln auf die Stallhaltung, die Viehhaltung, das Melken, die Milchgeschirre und die Behandlung der Milch sehr ausführlich eingegangen.

Diese Anforderungen an eine „hygienisch einwandfreie Milch" erfordern nichts Außerordentliches, sie sind leicht zu erfüllen und erfordern nur Kenntnis der Sache. Wolff (Kiel).

Paraschtschuk, S., Biologische Untersuchungsmethode für die Güte der Milch. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 68.)

Über diese Arbeit, die sich damit beschäftigt, das Wachstum verschiedener Rassen von Milchsäurebakterien in der sterilisierten Milch als Maßstab für die Beurteilung der Güte derselben im Rohzustand auszubauen, ist bereits aus der russischen Originalabhandlung an anderer Stelle dieses Blattes (Bd. 37. 1913. p. 94) referiert.

Neu sind Mitteilungen darüber, daß diese Methode in einer Petersburger Molkerei täglich 1½ Jahre lang mit Erfolg angewendet wurde; es wären Schwankungen in der Güte der eingelieferten Milch genau festzustellen gewesen. In dem Moment, in dem die Güte der Milch bestimmt werden soll, kann die Qualität durch Sterilisation in Kolben oder Flaschen dauernd fixiert werden. Wolff (Kiel).

Rieckhoff, P., Einiges über die Gewinnung und Behandlung roher Säuglingsmilch. (Liegnitzer Molkerei-Zeitg. Jg. 7. 1913. p. 97.)

Verf. spricht der Verwendung nicht sterilisierter Milch als Säuglingsmilch das Wort. Diese muß, wie ausgeführt, möglichst sauber und vorsichtig gewonnen werden. Die Einrichtung eines Musterstalles für Kindermilchgewinnung sowie dessen Betrieb ist eingehend besprochen. Die in sterilisierte Flaschen gefüllte Milch ist mindestens sechs Stunden lang auf 2—6° C zu kühlen. Anstatt der Gummiringe am Flaschenverschluß wären Pappringe zu verwenden, die nach jedesmaligem Gebrauch zu erneuern sind und die die Sterilisation gut vertragen; die Flaschenköpfe sind, um sie vor Verschmutzung beim Austragen zu bewahren, mit Papierkappen zu versehen sowie weitere Vorsichtsmaßregeln zu beobachten. Der Preis einer solchen Milch kann auf 40—60 Pfennig pro Liter berechnet werden. Wolff (Kiel).

Rosenau, M. J., The Milk Question. Boston (Houghton Miffin Co.) 1912.

The book is the publication of a series of lectures given by Professor Rosenau in Northwestern University, Chicago, Ill. and known as the N. W. Harris lectures. The book is written in a clear and concise style, and is eminently suitable for study by physician and layman. No claims to exhaustive scientific treatise is made. The author deprecates the attitude taken by some sanitarians, who are inclined to exaggerate the harm done by market milk. "To enlighten, not to frighten" should be the watchword. The bacteriology of milk is discussed in a general manner, showing that the battle is not so much against numbers of bacteria in milk, as specifically against pathogenic bacteria in milk. Numbers alone do not endanger milk unless harmful species are present. The author is an enthusiastic advocate of pasteurization. He does not deny that clean, raw milk would be ideal, but that the ideal is beyond reach at present and pasteurization is to be considered the only safe solution of the milk question. Milk inspection is criticised as carried out at present. Too much stress is laid on expensive equipment. Methods of production, the author claims, are of greater importance than elaborate equipment. "Clean milk may be produced with clean methods and poor equipment, but good milk cannot be produced with good equipment and poor methods." Consideration is given to the work of Medical Milk Commissions and some of the shortcomings pointed out.

The eradication of tuberculosis among cattle by means of the tuberculin test is strongly advocated. Very interesting is the history given by following milk from producer to consumer. The points, where contamination is most likely, are hereby made clear. In spite of the fact that a few insignificant mistakes have crept in, the book is one of great value and should be read by all those who are interested in a betterment of modern city milk supplies.

P. G. Heinemann (Chicago).

Steng, H., Die Milch brünstiger Kühe. (Arch. f. Hyg. Bd. 78. 1913. p. 219—247.)

In der Einleitung bespricht Verf. die Veränderungen der Milch, welche diese durch die Brunst der Kühe erleidet und führt die Literatur hierüber an. Im 2. Abschnitt folgen des Verf. eigene Untersuchungen; das hierzu geeignete Material war nicht leicht zu beschaffen, da nur Tiere verwendet werden konnten, die frei von anderen psychischen Einflüssen sind. So dürfen keine Veränderungen in der Bewegungsfreiheit, kein Stand- oder Futterwechsel während der Brunst vorgenommen werden, da alle derartigen Maßnahmen einen quali- und quantitativen Unterschied in der Milch hervorrufen. Die Kühe wurden stets genau zu derselben Zeit gemolken, trocken gefüttert und in großen hellen Ställen angebunden gehalten. Die Untersuchungen fanden immer täglich zu derselben Stunde statt. Ein reiches Tabellenmaterial (p. 233—240) zeigt die Einzelheiten der Untersuchungen. Im 3. Abschnitt wird die Verwendbarkeit als Kindermilch besprochen. — Die Zusammenfassung der Resultate lautet: Daß die Milch brünstiger Kühe in der chemischen Zusammensetzung schwankt; die Veränderungen können aber nicht regelmäßig nachgewiesen werden. Der Fettgehalt zeigt manchmal geringe Unterschiede in seiner Menge, gewöhnlich gleicht sich solches aber am folgenden Tage wieder aus. Milchzucker und Refraktion bleiben sich gleich oder werden nur wenig erhöht. Die Säuremenge verändert sich meist nicht; sie kann ausnahmsweise ein wenig höher, aber auch niederer sein. Höhere Säuregrade kommen wohl meist davon her, daß während dieser Zeit die Tiere schwer reingehalten werden können und hierdurch größere Mengen von Säurebildnern in die Milch gelangen. Das spez. Gewicht ist trotz des erhöhten Fettgehaltes öfters ein hohes, doch bietet es im ganzen wenig Veränderung, ebenso weichen Eiweiß, Trockensubstanz, und Aschengehalt nur sehr wenig oder gar nicht vom normalen Werte ab. Es ergibt sich weiter:

1. Da Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Milch brünstiger Kühe gegenüber der nicht brünstigen nachgewiesen werden können, sollte Brunstmilch als Säuglingsnahrung nicht verwendet werden.

2. Es ergaben Versuche die Möglichkeit, daß durch Brunstmilch bei Säuglingen Erkrankungen in Form der Dyspepsie ausgelöst werden. Es ist wahrscheinlich, daß dabei Toxine (Ovariotoxine) mit im Spiel sind.

3. Abmelkwirtschaften sollten von der Kindermilcherzeugung ausgeschlossen sein.

Rullmann (Darmstadt).

Stowell, E. C., Hilliard, C. M. and Schlesinger, M. J., A statistical Study of the Streptococci from Milk and from the human Throat. (Journ. of Infect. Dis. Vol. 12. 1913. p. 144.)

The authors studied 240 strains of streptococci in their fermentative reactions to carbohydrates and in their hemolytic reaction. The carbo-

hydrates used were dextrose, lactose, saccharose, salicin, raffinose, inulin, mannite. They followed Winslow's suggestion in classifying those, which produce less 1.2 per cent normal acid as non-acid producers and those, which produce more than 1.2 per cent acid as acid producers. For hemolytic tests rabbit's blood was used. They also studied the strains in regard to morphology, the gram stain and the violet positive test. The organisms were isolated from cow's milk and from the human throat. Only cocci occurring in three or more in a chain were accepted. Cocci in pairs were never used and the oval, chained form, Str. lacticus Kruse, was never accepted. Isolation was made on nutrient agar and the strains then cultivated on North's medium, which consists of 1 per cent agar and 3 per cent gelatin. Incubation was both at 20° and 37° C. From the North medium transfers were made to sugar-free broth to which the test sugars were added. To determine the acid formed, 5 cc. of the broth culture were titrated against normal one-twentieth NaOH solution with phenolphthalein as indicator.

The results showed that 98 per cent of all strains fermented dextrose, 76 per cent lactose, 63 per cent saccharose, 42,7 per cent salicin, 37,5 per cent raffinose, 9 per cent inulin and 1.5 per cent mannite. The order of these results differs materially from the order found by Winslow. The authors believe that the size or bulk of the molecule of the test substance and the stereo-chemical configuration have influence on the results. They found that they can classify 209 strains in nine groups according to the results. They call attention to a small group, which does not ferment dextrose, and which has been overlooked by other workers. They also think that the use of lactose litmus agar, which has been the isolation medium of some observers, leads to a selection and a ruling out of some strains. The authors discuss the discrepency of results obtained by various workers and conclude that different methods used necessarily produce different results. Comparison of the milk and throat streptococci leads to a distinct grouping. It is obvious that the throat streptococci are less fastidious as to the substance they ferment but are very susceptible to temperature relations, while the milk streptococci very seldom give positive acid reaction when grown in the presence of a substance higher in the series than saccharose but ferment through this substance equally well at either 20° or 37°. No correlation between the features could be observed by morphological studies, by the gram stain, by the violet positive test of Churchman or by hemolysis on rabbit's blood. The stability of the reactions was tested by repeating the tests after many transfers with the result that the tests were mostly positive.

In their summary the authors state that they have not found any of the features other than the fermentative reactions to correlate sufficiently with one another or with acid production to assist in fixing of the organisms in groups or in distinguishing the source of isolation. The seven organic substances tested show a definite order of availability for acid production. Milk streptococci are distinguishable from throat streptococci of the same morphology 1. by their higher acid production in substances in which they grow, 2. by their greater independance of temperature relations, 3. by their general incapacity to ferment more complex test substances than the disaccharids. On the other hand the throat strains in at least half the cases 1. ferment a more complex substance and 2. in almost all cases fail to ferment a higher test substance than the monosaccharid at room temperature.

P. J. Heinemann (Chicago).

Van de Velde, H., L'approvisionnement de lait à New-York. (Ann. et Bull. de la Soc. de méd. d'Anvers. Année 74. 1912. p. 11—44.)

Rapport détaillé sur la surveillance officielle du lait à New-York. Traduction française des prescriptions et des règlements du Department of Health de N.-Y. V. fait surtout ressortir le caractère pratique et les heureux résultats de cette organisation. Il la recommande aux administrations européennes. Des tableaux d'évaluation des laiteries, crèmeries, etc... complètent cet intéressant exposé. K. Kufferath (Bruxelles).

Goy, S., Über einige amerikanische Milchpulver. (Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmitt. 1913. p. 445—448.)

Nach des Verf. Angaben soll die Konservierung der Milch durch Trocknung sich immer mehr Eingang verschaffen und neben Amerika soll in letzter Zeit auch Deutschland sich diesem Industriezweige mehr zugewendet haben. Die Untersuchung einiger amerikanischer mehrere Monate alten Proben ergab einen leicht butterartigen Geruch und nicht ranzigen Geschmack. Die Angaben über die ausgeführten chemischen Untersuchungen zeigen, daß gute normale Vollmilch benutzt worden war und waren sogar einzelne Proben von sehr hohem Fettgehalt. Die verschiedenen Milchpulver wurden auch auf ihr Vermögen, durch Anrühren mit Wasser wieder ein frischer Milch vollständig gleichendes Produkt zu liefern, geprüft. Es ließ sich jedoch beim Anrühren mit kaltem Wasser keine Probe zu einer milchähnlichen Flüssigkeit aufschwemmen; ein Teil des Pulvers setzte sich am Boden des Gefäßes ab, der größere Teil haftete an den Gefäßwänden oder schwamm auf der Oberfläche und auch durch Schütteln ließ sich keine milchähnliche Flüssigkeit gewinnen. Beim Anrühren mit siedendem Wasser schied sich sofort klares gelbes Butterfett aus, wobei starker Geruch nach zerlassener Butter auftrat; eine Ausnahme machte die Magermilchprobe, welche naturgemäß nur ganz schwach fetthaltig war. Die mikroskopische Prüfung zeigte eine äußerliche Veränderung der Fettkügelchen infolge des Trockenprozesses; sowohl die deutschen als auch die amerikanischen Proben wurden bei ihrer Darstellung einer über 100° C gehenden Temperatur ausgesetzt, so daß eine Veränderung des Milchfettes ganz natürlich ist. Auch die stickstoffhaltigen Bestandteile sind verändert; die mit siedendem Wasser behandelten Proben schieden nach einigen Stunden das Kaseïn in Flocken aus, welches baldigst zu Boden sank. Einzelne Proben zeigten nach dieser Ausscheidung ein serumähnliches Aussehen. Jedenfalls hat das Kaseïn durch die angewendete Temperatur seine Quellungsmöglichkeit verloren.

Die Trockenmilch ist überall da von hervorragender Bedeutung, wo frische Milch, wie in den Tropen, nicht beschaffbar ist und ferner auch unter Umständen im Haushalte bei Bereitung von Mehlspeisen, dann bei Verpflegung größerer Menschenmengen, Manöver und Krieg. Zur Gewinnung eines frische Milch ersetzenden Getränkes ist sie aber infolge der zerstörten Enzyme, der geschädigten Eiweißkörper usw. nicht geeignet.

Rullmann (Darmstadt).

Sprinkmeyer, Fr., Versuche über die Einwirkung von Saugflaschen mit Rohr auf den Keimgehalt der daraus abgesaugten Milch. (Milchwirtsch. Centralbl. Jg. 42. 1913. p. 174.)

Nach allgemeiner Ansicht in ärztlichen Kreisen zählt das Darreichen der Säuglingsmilch aus Saugflaschen mit Rohr oder Schlauch mit zu den großen Gefahren für den Säugling, weil derartige Flaschen nur ungenügend zu reinigen sind.

Verf. versuchte durch Keimzählungen festzustellen, ob Saugflaschen mit starrem Rohr sich ohne allzu große Schwierigkeiten in genügender Weise reinigen lassen. Es wurde eine künstliche Absaugvorrichtung angebracht, von der abgesaugten Milch wurden je 0,5 ccm mit 100 ccm sterilen Wassers verdünnt, und von dieser Verdünnung je 1,0 ccm für die Bestimmung der Keimzahl angewandt, als Nährsubstrat wurde Gelatine nach Orla Jensen (Maanedskrift for Sundhedspleje 1909) verwendet, die nach den Arbeiten von Barthel den Vorteil bietet, daß die verflüssigenden Bakterien in ihrer Entwicklung gehemmt werden, ohne deswegen absolut unterdrückt zu werden.

Die während einer Zeitdauer von 15 Minuten aus den in genau gleicher Weise gereinigten Flaschen abgesaugte bzw. entnommene Milch zeigte folgende Keimzahlen:

Milch (gekocht) aus dem Aufbewahrungsgefäß	2 600	Keime
Aus einer Saugflasche mit Metallverschluß und Glasrohr	4 000	„
Aus einer Saugflasche mit Metall, Gummistück und Glasrohr	7 900	„
Aus einer Soxleth-Flasche (geschüttelt)	4 600	„

Auf die Art der Keime wurde leider keine Rücksicht genommen. Aus diesem Befunde konstatiert Verf., daß bei dem angewandten Reinigungsverfahren nur eine sehr geringe Zunahme der Bakterien bei der Milch aus allen 3 Flaschen stattfindet.

Saugflaschen mit Metallverschluß und Glasrohr, bei 7 Müttern in der Stadt Lüdenscheid eingesammelt, ergaben nach Verf. eine sehr geringe Zunahme des Keimgehalts. (Es erscheint aber doch eine Vermehrung der Keime in einem Falle von 4400 im Aufbewahrungsgefäß bis auf 34 000, ein zweitesmal bis auf 22 000 Keime in der Flasche [während 15 Minuten] bedenklich!) Verf. vergleicht die Vermehrung der Keime in gekochter Milch mit solcher in frischer Milch (!).

Von sechs verschiedenen Reinigungsmethoden eignet sich am besten dreimaliges Spülen mit kaltem Wasser, kurze Zeit Kochen mit Sodalösung, Reinigen mit einer Bürste, fünfmaliges Ausspülen mit kaltem Wasser und Aufbewahren gefüllt mit kaltem Wasser (das klar bleiben muß).

Werden die Saugflaschen mit Rohr nach der Reinigung längere Zeit mit Wasser bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so nimmt der Keimgehalt der aus diesen Flaschen abgesaugten Milch mit der Zunahme der Aufbewahrungszeit der Flaschen nach vorgenommener Reinigung zwar zu, „wird aber innerhalb zulässiger Grenzen erhalten“ (!), daneben folgende Tabelle:

Milch (gekocht) aus dem Aufbewahrungsgefäß			4 400	Keime
Aus Saugflaschen nach	3 Std.	bei 17° C.	5 800	„
„ „ „	6 „	„ 17° C.	7 000	„
„ „ „	10 „	„ 17° C.	8 600	„
„ „ „	24 „	„ 17° C.	20 400	„
„ „ „	3 „	„ 27° C.	16 800	„
„ „ „	6 „	„ 27° C.	20 400	„
„ „ „	10 „	„ 27° C.	23 800	„
„ „ „	24 „	„ 27° C.	60 000	„

Wolff (Kiel).

Zwick u. Krage, Über die Ausscheidung von Abortusbazillen mit der Milch infizierter Tiere. (Berliner tierärztl. Wochenschr. Bd. 29. 1913. No. 3.)

Zwick und Krage fanden in aseptisch gewonnener Milch von 3 Kühen, die 14 Tage bzw. 6 Monate bzw. 13 Monate vor der Milchuntersuchung abortiert hatten, Abortusbazillen. Weder die Milchdrüse noch die Milch selbst zeigten hierbei pathologische Veränderungen. Bei der Infektion von 2 Ziegen, denen Abortusbazillen durch den Zitzenkanal der einen Euterhälfte injiziert wurden, wurden mit der Milch dieser Tiere 4 bzw. 5 Monate lang Abortusbazillen ausgeschieden und zwar ausschließlich aus der infizierten Euterhälfte, während die Milch der nicht infizierten Euterhälfte frei von Abortusbazillen war. Im Blute dieser Tiere waren Agglutinine gegen Abortusbazillen enthalten. In weiteren Versuchen wurden Ziegen Abortusbazillen intravenös und subkutan einverleibt. In der Milch zeigten sich bei zweien der Tiere schon nach 24 Stunden Abortusbazillen, die Ausscheidung hielt mehrere Wochen an, bei einer dritten Ziege traten erst nach 48 Stunden Abortusbazillen auf und waren nur 3 Tage lang in der Milch nachzuweisen. W. Grimmer (Dresden).

Frost, G., Milchwirtschaftliche Tagesfragen. (Liegnitzer Molkerei- u. Käsereiztg. Jg. 7. 1913. p. 290.)

Der direkte Milchkonsum im Volke ist bedeutend gestiegen, nicht im letzter Linie durch die Abstinenzbewegung, so daß viele Molkereien von der Butterproduktion zum Milchversand übergegangen sind. Das bedarf, wie ausgeführt wird, Sachkenntnis. Verf. spricht für die Zentralisation des Straßenmilchhandels. Was „die Schlagwörter Hygiene, Bakterien, Bazillen“ anbeträfe, so träfe ein Vorwurf die Produzenten und nicht die Molkereien. Hier wäre Organisation am Platze. Der Behandlung der Milch im Haushalte sei mehr Aufmerksamkeit zu schenken, dort wäre auch die Alkoholprobe angebracht. Städtische Milch- und Molkereiwirtschaften bedeuten nicht besseres Produkt, sondern lediglich Organisation. Die Erörterung weiterer, wichtiger Tagesfragen führt über den Rahmen dieser Zeitschrift hinaus und ist daher im Original nachzulesen. Wolff (Kiel).

Ernst, Wilhelm, Grundriß der Milchhygiene für Tierärzte. Mit 26 Textabbild. u. 5 farb. Tafeln. Stuttgart (Ferd. Enke) 1913. Preis 8 *M* geheftet, 9,40 *M* gebunden.

Das dauernde Erscheinen neuer Werke auf jedem Gebiete der Milchkunde ist wohl das bedeutsamste Zeichen des regen Interesses, dessen sich in den letzten Jahren die so lange recht stiefmütterlich behandelte Milch zu erfreuen hat. Die große Zahl der täglich sich mehrenden Forschungsergebnisse zahlreicher Autoren, die die noch zu lösenden Probleme von den verschiedensten Seiten, vom Standpunkte des Theoretikers und Praktikers, von dem des Human- oder Veterinärmediziners, Nahrungsmittelchemikers oder Milchwirtschaftlers, betrachten, bedingt es, daß auch verschiedene Werke über den gleichen Gegenstand ein verschiedenes, ich möchte sagen, individuelles Gepräge tragen. Ein solches Werk ist auch das Ernstsche Buch, das selbst bei nur oberflächlicher Betrachtung erkennen läßt, wie grundverschieden die Behandlung des vorliegenden Stoffes — der Milchhygiene — von der der bisher hierüber existierenden Werke ist. Wir erkennen in der Einteilung des Stoffes deutlich drei Hauptgruppen: Physiologie der Milch, Pathologie der Milch, Milchkontrolle, die, jede für sich weitgehend gegliedert, in insgesamt 11 Kapiteln untergebracht sind. Ist das Werk auch in erster Linie für den Tierarzt bestimmt, so werden doch auch andere, und nicht zum letzten

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

der Landwirt, reiche Belehrung aus ihm schöpfen können. Insbesondere gilt dies für die Kapitel V (Milchgewinnung), VI und VII (Einflüsse auf die Milchbildung und die Eigenschaften der Milch), sowie einzelne Teile der Kapitel VIII—XI, welche die Bakterien der Milch und die Milchkontrolle behandeln. Zahlreiche, z. T. in farbigem Druck ausgeführte Abbildungen, die zum größten Teile von Ernst selbst herrühren, illustrieren in vorzüglicher Weise die normalen und abnormen Verhältnisse der Milch. Bedauerlich hingegen ist der vollständige Verzicht auf „Abbildungen von Apparaten, die in jedem Händlerkatalog zu finden sind". Bei der reichen Erfahrung Ernsts durfte man wohl erwarten, daß er denen, die Milchuntersuchungen nur selten ausführen, diejenigen Apparate auch im Bilde vorführte, die sich am besten bewährt haben, um so mehr, als ständig neue Apparaturen angekündigt werden, die diesem oder jenem Zwecke dienen sollen, oft aber nicht den billigerweise an sie zu stellenden Anforderungen entsprechen. Bei einer Neuauflage wäre es weiterhin sehr wünschenswert, wenn zahlreiche Literaturzitate, die, abgesehen von der Herkunft der Abbildungen, ebenfalls gänzlich fehlen, eingefügt würden. Der Wert des Buches, der schon jetzt außer jedem Zweifel steht, würde dadurch wesentlich erhöht werden.

W. Grimmer (Dresden).

Frost, G., Einiges über die Gewinnung und Behandlung roher Säuglingsmilch. (Molkerei- u. Käserei-Ztg. Liegnitz. Jg. 7. 1913. p. 279.)

Im Interesse des Molkereiwesens greift F. die diesbezüglichen Ausführungen von Rieckhoff in gleichem Blatt p. 97 an. Als „Säuglingsmilch" sei heutzutage jede sauber gewonnene Milch zu verwenden. Rentabel sei eine derart von R. vorgeschlagene Musterwirtschaft nur in einem Betrieb, der in unmittelbarer Nähe der Großstadt läge. Die Milch solle im Haushalt vorsichtiger und besser behandelt werden. Wolff (Kiel).

Lane-Claypon, Janet E., The biological Properties of Milk, both of the human Species and of Cows, considered in special Relation to the Feeding of Infants. (Report to the Local Governm. Board England. New Ser. No. 76. 1913.)

The Author comes to the conclusion that most of the ferments present in milk are derived from the bacteria which are found in milk. She considers that there is no evidence to show that milk free from bacteria contains any ferments capable of assisting in the digestion of food by any of the processes of digestion at present known to us. The only ferments present in bacteria free milk are those which are known to be present in large quantities in the blood, and ferments (whose presence is not firmly established) which act upon substances not known to occur in the processes of digestion. Raising milk to 100° C. does not destroy or apparently injure any of the chemical substances necessary for the health of the child. A Bibliography of the subject, containing 298 references, is appended to the Report.

R. T. Hewlett (London).

Hanauer, Kommunale Milchversorgung. (Molkerei- und Käserei-Ztg., Liegnitz. Jahrg. 7. 1913. p. 452.)

Während über die Nützlichkeit und Notwendigkeit der städtischen Milchhöfe (Milchzentralen) die Ansichten noch geteilt sind, herrscht Einverständnis darüber, daß es Sache der öffentlichen Fürsorge sein muß, in kommunaler Art die Kinder besonders der ärmeren Bevölkerung mit einwandsfreier

Säuglingsmilch zu versorgen. Verf. schlägt Art und Weise vor, wie dies geschehen könnte, insonderheit durch Milchküchen. Wolff (Kiel).

Jensen, Orla, Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft. 8°. 182 pp., 60 Text-Abb. Jena (G. Fischer) 1913.

Der Inhalt des Werkes gliedert sich in einen (kürzeren) allgemeinen und einen (ausführlicheren) speziellen Teil. Im allgemeinen Teile werden zunächst die Mikroorganismen insgesamt besprochen, ihre Morphologie und Physiologie, sodann die Gärungsprozesse, die Enzyme sowie die Züchtungs- und Untersuchungsmethoden. Verf. weist hier auf S. 25 darauf hin, daß der neuerdings von Burri empfohlene Pyrogallol-Verschluß (mit doppelten Wattestopfen) für Anaëroben-Kulturen bereits vor ca. 20 Jahren von dem dänischen Forscher Stribolt benutzt und in der 1894 von Salomonsen veröffentlichten „Bakteriologiske Teknik“ auch schon abgebildet worden ist. Weiterhin werden die Bakterien sowie die Hefen und Schimmelpilze etwas näher ins Auge gefaßt und speziell die milchwirtschaftlich wichtigen Arten im Bilde vorgeführt und in ihren wesentlichen Eigenschaften geschildert.

Den speziellen Teil eröffnet ein Abschnitt über Reinigung und Milchgewinnung mit den Worten: „Durchgeführte Reinlichkeit ist nicht nur der erste Hauptsatz der Milchwirtschaft, sondern hierin ist auch der allerwichtigste Teil der sogenannten Hygiene enthalten.“ Leider mit vollem Rechte heißt es aber weiter: „Nur äußerst wenige Menschen verstehen, was Reinlichkeit eigentlich ist.“ Die Jensens Ausführungen hierüber lesen, werden es aber hoffentlich verstehen, denn diese sind von musterhafter Klarheit und Eindringlichkeit. Der zweite Abschnitt ist der normalen und anormalen Mikroflora der Milch gewidmet, der dritte der Konservierung der Milch und ihrer Behandlung für den direkten Konsum, der nächste der Anwendung der Milchsäuregärung in der Milchwirtschaft. Auch wer mit diesen Dingen bereits gut vertraut ist, wird hier so manches Interessante finden. Allerhand Einzelheiten aus der vorbildlichen dänischen Milch-Versorgung werden vorgeführt, die volle Beachtung verdienen. Dasselbe gilt in bezug auf die Darlegungen über die Verwendung der Milch im Haushalt, die Überschätzung des Jaourt usw. Nach einer ebenfalls sehr lesenswerten Erörterung der Rahmsäuerung folgen dann im fünften Abschnitt die Ausführungen über die Mikroflora der Butter und in den beiden nächsten Abschnitten die Besprechungen der erwünschten und der fehlerhaften Vorgänge bei der Käsereifung. Da wir die Erhellung gerade dieser Gebiete nicht zum wenigsten den Forschungen Jensens zu verdanken haben, so ist es wohl selbstverständlich, daß diese neueste Zusammenfassung seiner Ansichten jedem Leser höchst willkommen sein wird. Der letzte Abschnitt des Werkes bildet eine natürlich gleichfalls den neuesten Gesichtspunkten Rechnung tragende Besprechung der Beurteilung der Milch. Auch hier marschiert ja Dänemark (nicht zum wenigsten Dank den Bemühungen des Verf.) entschieden an der Spitze. Was auf den letzten Seiten über Qualitäts-Bezahlung der Milch gesagt wird, verdient allerorten eingehendste Beachtung. Das gleiche gilt für den Schlußsatz des Werkes: „Dringt erst die Hygiene in den Kuhstall hinein, dann wird sie auch überall Eingang finden: Gesunde und reine Kühe, gute Milch, gesunde Kinder!“

Das Buch ist dem Andenken E. von Freudenreichs gewidmet. Es führt denselben Titel wie die vor Jahren im gleichen Verlage erschienene Schrift dieses verdienstvollen Forschers, die sich seinerzeit in drei Auflagen bewährt hat. Jensens Werk bringt einen sehr vervollkommneten Ersatz für sie. Inhalt wie Darstellung machen es in gleicher Weise zu einem ausgezeichneten Lehrbuch. Es ist sehr begreiflich, daß das 1912 erschienene dänisch geschriebene Gegenstück zu dieser Schrift, die „Maelkeribakteriologi", in den nordischen Ländern eine sehr gute Aufnahme gefunden hat. Wenn der Verf. im Vorwort sagt, daß er hoffe, sein Werk werde außer den Molkereifachleuten auch Ärzten, Tierärzten und Chemikern von Nutzen sein, so wird er sich sicher keiner Täuschung hingeben. Vor allem sollte das Buch aber auch in höheren und niederen landwirtschaftlichen Unterrichts-Anstalten sowie in Haushaltungs-Schulen allgemein Eingang finden.

Für die sicher zu erwartenden weiteren Auflagen seien einige Wünsche und Verbesserungs-Vorschläge freundlicher Berücksichtigung empfohlen:

Der Verf. beherrscht die deutsche Sprache in einer für einen Ausländer unstreitig meisterlichen Weise. Immerhin sind einige sprachliche Härten und Unrichtigkeiten untergelaufen, die speziell mit Rücksicht auf den Lehrbuchcharakter des Werkes ausgemerzt werden möchten. Daß ich bei der Einteilung der Milchsäurebakterien und ihrer Verwandten mehrfach die Speziesnamen pathogener Formen voranstellte, hängt allerdings nicht mit „phylogenetischen Gründen" (p. 36) zusammen. Nach den international geltenden Regeln der botanischen Nomenklatur mußte (aus Gründen der Priorität) so verfahren werden. Daß Ackererde nur 1—2 Millionen Keime pro g enthält (p. 67) ist ein Irrtum. Bac. minimus mammae Gorini hat mit Bact. pyogenes sicher nichts zu tun (p. 75); er zeigt durchaus Streptokokken-Natur. Bei der Erwähnung des Kumiß (p. 103) wäre auf Rubinskys Arbeit Rücksicht zu nehmen. Die historischen Ausführungen in bezug auf die Erforschung des Ranzigwerdens der Butter (p. 118) und hinsichtlich der Beteiligung von Mikroorganismen und Enzymen bei der Käsereifung (p. 134) bedürfen einer Änderung; in beiden Fällen war schon von Duclaux ziemlich viel festgestellt worden. Daß guter Cheddarkäse trotz der Impfung mit Milchsäure-Streptokokken ebenfalls fast nichts wie Laktobazillen enthält, braucht nicht mehr nur angenommen zu werden (p. 141). Wm. Stevenson hat dies vor mehreren Jahren festgestellt; ein bei diesen Untersuchungen erhaltenes Klatschpräparat ist in meinem „Praktikum" abgebildet. Erfolgversprechende Impfversuche sind auch seither in Schottland bereits in größerer Zahl ausgeführt worden.

Ich brauche wohl nicht besonders zu betonen, daß diese kleinen Ausstellungen der hervorragenden Gesamt-Leistung keinerlei Abbruch tun. Meiner Überzeugung nach ist das vorliegende Werk das Beste seiner Art.

Löhnis (Leipzig).

Rosam, A., Eine einfache mikroskopische Beurteilung des Gehalts der Milch an Mikroorganismen. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 333.)

Ein Tropfen Milch wird mit einem Tropfen Methylenblau mit einem kleinen Zusatz von Pyridin vermischt (in kleinem Löffel), über der Flamme erhitzt und das mit einer ausgewogenen Platinöse entnommene Material zwischen Deckglas und Objektträger beobachtet; man kann das Gewicht des Öseninhalts auf 0,002 g einrichten. Die Zahl der auf der ganzen Fläche des Deckgläschens vorhandenen Zellen wird aus dem gegebenen Durchschnitt des Gesichtsfeldes (das z. B. 0,36 mm beträgt) ermittelt; im ganzen waren also Gesichtsfelder vorhanden: $(18)^2 : \left(\frac{0,36}{2}\right)^2 \times 3.14 = 3184$, in welchen sich 3184×2 (Anzahl der im Gesichtsfeld beobachteten Zellen) $= 6368$ Zellen befanden, die in 0,002 g Milch enthalten waren. Diese Zahl wird auf 1 g umgerechnet. Bei größerer Keimzahl nimmt man zweckmäßig ein Netzmikrometer zu Hilfe. Verf. empfiehlt diese Methode zur raschen und praktischen Beurteilung der Milch bei annähernder Konstatierung der Keimzahl.

Wolff (Kiel).

Náray, Andor, Sárga festanyagot képzö új baktérium a tejben. [= Ein neues Bacterium, das in der Milch einen gelben Farbstoff hervorbringt.] (Kisérletügyi közlemények. XV. 1912. p. 671—687. 2 tabl.)

Es wird genau beschrieben und abgebildet die neue Art Bacterium chromoflavum. Matouschek (Wien).

Bertin Sans et **Gaujoux,** Les catalases du lait de vache; leur signification au point de vue de la valeur hygiénique du lait. (Ann. de méd. vétérin. Année 62. 1913. p. 269.)

Les auteurs admettent qu'un lait normal sain, ne doit pas donner plus de 1 cc. d'O (mèthode Sarthou); si le lait donne plus de 1,5 ou 2 cc. d'O il doit être considéré comme inutilisable pour l'alimentation des enfants, et de même plus de 3 à 4 cc. pour les adultes. S. et G. donnent les circonstances qui modifient la teneur catalytique du lait.

H. Kufferath (Bruxelles).

Rogers, L. A. and Davis, Brooke J., Methods of classifying the lactic-acid bacteria. (U. S. Departm. of Agricult. Bur. of Animal Ind. Bull. 154. 30 pp. 1912.)

A large collection of bacteria of the general lactic-acid type was studied with a view of determining which of the culture characters could be best used for purposes of classification.

Particular attention was given to the fermentation of sugars, alcohols, and polysaccharides. On the results of these tests the culture were grouped on the basis of frequency of occurrence of certain types. It was found that the most common strain fermented dextrose, lactose and galactose, occasionally fermented saccharose and mannite, but very rarely fermented glycerine, raffinose or inulin.

Another group, occurring less frequently, had much higher fermentative ability. In addition to dextrose, lactose and galactose, nearly all members of this group fermented saccharose, glycerine, mannite and raffinose and many of them formed acid from inulin.

Another comparatively rare group resembled the first in morphology and general culture characteristics but was distinguished by the ability to liquefy gelatin. Correlated with this character was usually the ability to ferment saccharose, glycerine and mannite. Raffinose and inulin were not fermented.

A fourth group was made up of micrococci liquefying gelatin but having weak fermentative ability. These evidently take little part in the spontaneous souring of milk. The conclusion was drawn that the lactic-acid bacteria could be divided into natural groups, each having certain characters in common. The individual members of the group may vary from the type, which is determined by frequency of occurrence of one or more characters. The separation into varieties or strains on the basis of the presence or absence of certain arbitrarily selected characters leads only to confusion.

Author abstract.

Kühl, H., Die Milchsäurelangstäbchen. (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 74. 1913. p. 384 ff.)

Unter Zugrundelegen der neueren Literatur über Milchsäurelangstäbchen, wie solche Leichmann, Lehmann und Neumann und aus letzter Zeit A. Wolff zu verdanken ist, bespricht Verf. die langen

Milchsäurestäbchen, wie sie außer in gewöhnlicher Milch und Käse, im Kefir, Yoghurt, Mazun usw. vorkommen, in hygienischer Hinsicht. So fanden Tissier und Sittler, daß hauptsächlich zwei Arten in den ersten Jahren die Darmflora des Kindes beherrschen, ein säurebildendes Langstäbchen, Bacillus bifidus und der sogen. Enterococcus, der den gewöhnlichen Milchsäurebakterien und besonders dem Bact. Güntheri sehr nahe steht. Diesen gegenüber treten Bact. coli und B. perfringens zurück, und nur bei Darmentzündungen und Darmkatarrhen werden sie überwiegend beobachtet. B. bifidus ist für die Darmflora der Kinder sehr günstig. Herter fand, daß im Laufe der Jahre die Flora sich ändert und B. bifidus immer mehr abnimmt, aber bei gesunden und starken Individuen auch im mittleren Lebensalter noch ein wichtiger Repräsentant ist. Die Fäulnisbakterien treten bei den meisten Individuen in den Vordergrund, und dann können die häufig beobachteten Selbstvergiftungen vom Darme aus in Erscheinung treten. Bei dem immerhin noch reichen Eiweißgehalt des Kotes und schlecht arbeitendem Verdauungsapparat vermehren sich die Fäulnisbakterien unter günstigsten Bedingungen, und Herter sagt daher, je größer die Zahl der Fäulnisbakterien, desto schwächer der Gesundheitszustand. Da nun die Fäulniserreger als säurefeindlich einen schwach alkalischen Nährboden beanspruchen, so kann durch geringe Säurezufuhr ihre Entwicklung geschädigt werden, und V. Brudny hat vollkommen recht, wenn er u. a. sagt: es ist „ganz gut möglich, daß die Fäulniserreger im Darm einerseits direkt durch die Milchsäure geschädigt werden". So haben wir uns die gesundheitlich günstige Einwirkung der Milchsäurebildner zu erklären, unter welchen jetzt das reichlichst im Yoghurt vorkommende Langstäbchen, Bac. bulgaricus, die wichtigste Rolle einnimmt. Diese mehr oder minder stark säurebildenden Langstäbchen passieren Magen und Dünndarm ungehemmt. A. Wolff hat in seiner trefflichen Arbeit über die Milchsäurelangstäbchen auf den hygienischen Wert derselben aufmerksam gemacht und gehören zu ihnen auch alle die spezifischen Bakterien der verschiedenen orientalischen Sauermilcharten. Sehr zu wünschen wäre, wenn nach Löhnis Vorschlag die Bezeichnungen in der milchwirtschaftlichen Bakteriologie auf Grundlage der biologischen Leistungen der Bakterien etwas einheitlicher würden.

Schon im Altertum war ohne Kenntnis der inneren Gründe die Sauermilch bei den Ärzten sehr geschätzt, und wie sehr in neuester Zeit ihre Wirkung in den verschiedensten Arten bewertet wird, ist bekannt. — Ebenso wie Yoghurt kann auch unsere altbekannte Sauermilch durch Einsaat von Reinkultur in die sterile Voll- oder Magermilch hergestellt werden, da auch der letzteren Einfluß auf den Darm ein energisch desinfizierender ist.

Rullmann (Darmstadt).

Arkwright, J. A., Natural Variation of B. acidi lactici with Respect to the Production of Gas from Carbohydrates. (Journ. of Hygiene. Vol. 13. No. 1. p. 68—86, April 1913.)

A bacillus belonging to the B. acidi lactici group was repeatidly isolated from the urine of a patient. It occurred in two varieties which differed as regards gas-formation. Variety I formed acid and gas from sugars and alcohols, variety II formed acid only and no gas from the same sugars and alcohols (glucose, lactose, maltose, galactose, mannitol, adonitol, glycerin). The two varieties gave identical serum reactions as regards agglutination and absorption of agglutinin. Both varieties remained constant in their characters after sub-culture on broth and agar, but after sub-culture in sodium formate broth variety II produced gas from the sugars.

R. T. Hewlett (London).

Berg, Hugo, Über die Bazillen der Yoghurt-Milch. [Dissertation.] Hannover 1913.

Berg bediente sich zu seinen Untersuchungen einer Laktobazillenkultur französischen Ursprungs (Institut Le Ferment, Paris). In sämtlichen Präparaten fand er den Bacillus bulgaricus; weiterhin ein zweites Stäbchen, das verwandtschaftliche Beziehungen zum Bacterium coli hat, wie vorzugsweise aus Agglutinationsversuchen hervorgeht, das aber trotzdem nicht als zur Coligruppe gehörig zu betrachten ist, da es sich hinsichtlich seines Wachstums in einigen Punkten von den Colibakterien unterscheidet. W. Grimmer (Dresden).

Wiegert, E., Zur Bereitung und Anwendung von Yoghurtmilch. (Molkerei-Ztg., Berlin. Jahrg. 23. 1913. p. 326.)

Auch Verfasserin scheint irrtümlich Streptococcus und Diplococcus im Yoghurt als besondere Arten auseinander zu halten, während sie doch ein und derselben Art, nämlich Streptococcus lacticus bzw. Bact. lactis acidi, angehören. Es ist Wesen, Wirkung und Zubereitung des Yoghurt, auch im Haushalt, besprochen. Verfasserin sagt (wie auch vom Ref. beobachtet wurde), daß es Milchsorten (Kuhmilch) gibt, welche dem Wachstum der Yoghurtbakterien sehr günstig sind, so daß die Gerinnung schon innerhalb zwei bis drei Stunden zustande kommt, während in anderer Milch die Bereitung des Yoghurt vier bis fünf Stunden in Anspruch nimmt, äußerlich kann die Serumausscheidung schon eine verschiedene sein. Schon um der Gefahr der Hefeinfektion vorzubeugen, ist die Yoghurtmilch möglichst am Tage der Herstellung zu genießen. Wolff (Kiel).

Nicolae, O., Fermentierte Milch. (Molkerei- u. Käserei-Ztg., Liegnitz. Jg. 7. 1913. p. 276.)

Wie in diesem Artikel, so ist auch in manchen anderen Zeitungen und Zeitschriften die fälschliche Ansicht geäußert, daß im Yoghurt drei Organismenarten vertreten sein müßten, und zwar: 1. der „Bacillus bulgaricus“ (besser als Bacterium bulgaricum bezeichnet), 2. ein Streptococcus (Streptococcus lacticus, Str. lactis, bzw. Bact. lactis acidi) und 3. ein Diplococcus. Letzterer Organismus aber ist nichts anderes als die unter 2. bezeichnete Bakterienart, d. h. die gewöhnliche Milchsäurebakterie, die meistens in Doppelform auftritt und gleichzeitig auch Ketten von der Form eines Streptococcus bildet, bzw. bilden kann. Die Ansicht, daß im Yoghurt auch eine Hefe vertreten sein müßte, findet man richtigerweise in neuerer Zeit nicht mehr geäußert.

Wolff (Kiel).

Freund, W., „Taette“, die Sauermilch der Skandinavier. (Molkerei-Ztg., Hildesheim. Jg. 27. 1913. p. 661.)

Verf. macht auf das „neue“ Sauermilchprodukt, die „Taette“, aufmerksam, eine fadenziehende Sauermilch, welche in Schweden, Norwegen und den finnischen Küstenstrichen von der dortigen arischen Bevölkerung seit Urväterzeiten genossen wird und je nach der Gegend die Namen Taette, Tätmjölk, Longmjölk, Piimä u. a. m. führt. In Deutschland bringt die Meierei C. Bolle A.-G., Berlin, das nach eigenem Verfahren ihres Betriebslaboratoriums hergestellte Erzeugnis unter dem zum Markenschutz angemeldeten Namen „Bolle-Taette“ zum Verkauf, auch läßt die von einer Trockenfermentfirma in Breslau beantragte Eintragung des Wortes „Taette“ als Warenzeichen darauf schließen, daß diese das gleiche Produkt aufgenommen hat bzw. aufzunehmen beabsichtigt.

Die erste Veröffentlichung über Taette brachte Linné im Jahre 1732, zusammenfassende Studien Olsen-Sopp, in vorliegendem Blatt 1912. — Die Taette, eine schleimige, kohlensäure- und alkoholhaltige Milchform ist das Produkt der Symbiose mehrerer Organismen, von denen nach Olsens Untersuchungen hauptsächlich ein „Streptobacillus“, ein „Laktobacillus“ und eine „Saccharomyces-Hefe“ als unbedingt zur obligaten Taetteflora gehörig anzusehen sind, während die meist gleichzeitig auftretenden Torula- und Moniliahefen, „Lactococcus“ und das Oidium lactis mehr die Rolle von Begleitorganismen spielen. Vom Verf. ausgeführte Untersuchungen, die kurz angegeben im allgemeinen die Resultate Olsens bestätigen, sollen später ausführlicher veröffentlicht werden[1]).

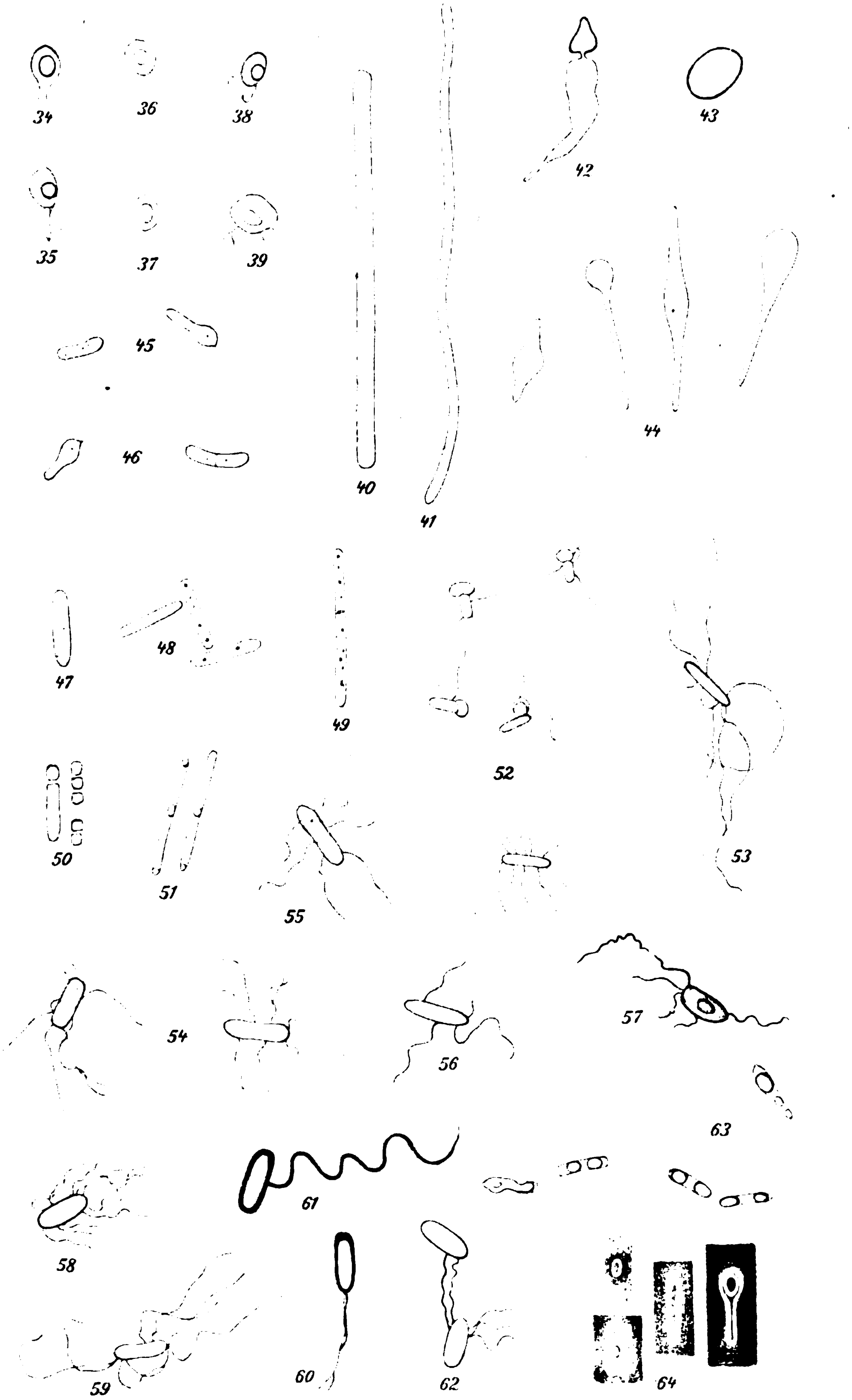
Die Bereitung genußfertiger Taettemilch aus dem nordischen Originalausgangsmaterial — Verf. wählte solches aus den finnischen Schären — geschieht in der Art, daß abgekochte und auf ca. 30° C abgekühlte Milch mit der Ausgangskultur versetzt und die so geimpfte Milch ca. 3 Tage bei gleichbleibender Temperatur gehalten wird. Der Geruch des Produktes ist schwach säuerlich aromatisch, der Geschmack angenehm mildsauer, und ruft im Munde ein ganz charakteristisches, kühlendes Gefühl hervor. (Es ist zugleich, wie gesagt, schleimig.) Näheres über die Bereitungsweise wäre im Original nachzulesen. Zum Schlusse ist auf den hohen Nähr- und diätischen Wertgehalt der Taette hingewiesen und abschließend eine Literaturzusammenstellung gegeben. Wolff (Kiel).

Kühl, H., Über eine Käsevergiftung, verursacht durch eine mit Bact. lactis aërogenes übereinstimmende Bakterie. (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmitt. Bd. 25. 1913. p. 193—204.)

Nach einleitenden Mitteilungen über das erste Bekanntwerden von Vergiftungen durch Käse und Angaben über Literatur ist zu ersehen, daß bei solchen Erscheinungen meist Colivarietäten eingewirkt haben und nur in einzelnen Fällen wurde eine Gesundheitsschädigung durch das Bact. lactis aërogenes Escherich (Bacill. acidi lactici Hueppe) festgestellt. Escherich bewies, daß Bacill. lactis aërog. für die Säuglingsdiarrhöen verantwortlich zu machen ist und in der Folgezeit wurde allgemein erkannt, daß manche Varietäten dieser Art mit der ihr sehr nahestehenden Art des B. coli bei Mensch und Tier akute und chronische Darmerkrankungen herbeiführen können. Ebenso wurde festgestellt, daß gewisse Coli-Aërogenesformen Euterentzündungen beim Milchvieh hervorrufen und für die Käserei gefährlich werden, da die pathogenen Eigenschaften im Laufe der Käsefabrikation und Reifung nicht verloren gehen. Es folgen dann Angaben über die Art der Krankheitserscheinungen in verschiedenen genau geschilderten Fällen und dann werden vier Proben von Käsen, welche Vergiftungen hervorgerufen haben, untersucht.

---

[1]) Verf. hat unzutreffender Weise das gefundene Milchsäurelangstäbchen als zur Sammelart des Bac. caucasicus (Weigmann) anstatt zur Gruppe Bacterium caucasicum L. et N. bzw. Bacterium casei (v. Frdrch.) gehörig bezeichnet.


34
36
38
43
42
35
37
39
45
44
46
40
41
47
48
49
52
53
50
51
55
54
56
57
63
58
61
59
60
62
64

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Aus dem experimentellen Teil ergibt sich, daß zur Erkennung der Einwirkung auf den tierischen Organismus physiologische Untersuchungen (p. 198—200) angestellt wurden, welchen dann die uns am meisten interessierenden bakteriologischen folgen (p. 200—203). So ergab die Untersuchung des erbrochenen Schleimes im makroskopischen Bild nur wenig feste Bestandteile, während mikroskopisch Epithelialstückchen mit vereinzelten Bakterien der oben genannten Form sich fanden. Der Schleim wurde auf Kartoffelkeile und Agar geimpft und dann nach 24 Stunden bei 37° C auf Malachitgrün — Endo — und Alizarin-Agar stark verdünnt übertragen, wobei Reinkulturen erzielt wurden.

Bei allen genauer beschriebenen Untersuchungen fand sich immer die gleiche Wuchsform, welche dann biologisch näher bestimmt wurde. Das Temperaturoptimum liegt bei 37° C, wobei ein sehr rasches Wachstum bemerkbar ist; auf Endo und Malachitgrünagarplatten zeigt sich in starker Verdünnung aufgetragen bei 37° schon nach 4—5 Stunden starker Belag.

Dieses rasche Wachstum erklärt die nach einigen Stunden eintretende Wirkung der Bakterien, obwohl Gifte nicht vorgebildet wurden. Morphologisch erinnert dies Bacterium an B. coli commun.; es war jedoch plumper gebaut und ist unbeweglich. Charakteristisch wächst es auf Milchzuckeragar unter starker Gasbildung. Impfte man aus starker Verdünnung, dann war nach 12 Stunden bei Stichkultur dieser Nährboden völlig zerklüftet; Milch gerinnt bei 37° innerhalb 6 Stunden unter Gasentwicklung. Bouillon trübt sich nach 4 Stunden und ältere Bouillonkulturen bilden körnigen Bodensatz. Auf Gelatineplatten bilden sich runde tröpfchenförmige, erhabene Kolonien, die bei schräg durchfallendem Licht rotviolett erscheinen. In Gelatinestichkulturen tritt perlschnurartiges Wachstum auf, an der Oberfläche schwach irisierend; auf Endoagar Wachstum unter starker Rötung. Demnach kommt die gefundene Bakterie dem Bact. lactis aërogen. Escherich am nächsten und stimmt mit des Autors eigenen Angaben überein.

Verf. stellt fest, daß die Ergebnisse mit den von Lochte angeführten charakteristischen Merkmalen übereinstimmen. Besonders sei erwähnt, daß die Vergiftung sich, wie auch früher beobachtet, nicht sofort nach dem Käsegenusse bemerkbar macht, sondern erst nach gewisser Zeit. Hiermit steht die Tatsache im Einklang, daß der Nachweis durch tierphysiologische Versuche erbracht werden konnte und daß fertig gebildete Gifte im Käse (Tyrotoxin, Toxalbumin Vaughan) nicht vorhanden waren. Die Wirkung ist also der mittelbaren Lebenstätigkeit der Bakterien zuzuschreiben, nicht irgendwelchen Giftstoffen. Aus den Käseproben und dem Erbrochenen eines im Institut erkrankten Herrn wurde eine Aërogenesbakterie isoliert, die der von Escherich beschriebenen sehr nahe steht, wenn nicht sogar mit ihr identisch ist. Diese Bakterie besaß ebenso pathogene Eigenschaften wie der Käse und die Wirkung trat noch intensiver hervor. Sehr auffallend war die Beobachtung, daß der Käse und die aus ihm isolierte Bakterie den Versuchstieren gegenüber nur in der Injektion wirkten und per os genossen keine Schädigung hervorriefen.

Rullmann (Darmstadt).

Percival, J. and **Mason, G. H.**, The Micro-Flora of Stilton Cheese. (Journ. of Agricult. Science. Vol. 5. 1913. p. 222—229.)

The paper gives the results of some five years work directed towards the determination of the kinds of bacteria and fungi present in Stilton Cheeses

and to the number of organisms at different periods of ripening. The distribution of organisms in the cheeses was studied by the examination of stained sections.

The results of the investigations are sumarised as follows:

1. The numbers of bacteria and fungi in a newly-made Stilton may rise to the enormous number of 1000 to 3000 millions per gram in the first week.

2. There is a gradual fall in the numbers up to the time of ripeness (100 to 150 days old) when 50 to 100 millions only are found.

3. In the early stages lactic acid bacteria are most abundant. When the cheese is ripe the lactic acid bacteria are few and weakened in physiological power; Penicillium glaucum and a form of Torula are then abundant.

4. Five characteristic organisms are found in all Stilton cheeses examined, viz. — 1. Streptococcus lacticus, 2. a short rod shaped form of Bs. acidi lactici, 3. a species of Tyrothrix, 4. Penicillium glaucum, and 5. a round form of Torula, sometimes accompanied or replaced by an oval form. In cheeses where "starters" were used the authors found a large celled form of Streptococcus lacticus.

5. Penicillium glaucum was found to be checked in its growth by the Tyrothrix. Golding (Reading).

Allemann und Müller, Das Vorbrechen und das Scheiden der Käsereimolke. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 225.)

Nach Besprechung des Zwecks und Wesens des Vorbrechens und des Scheidens der Käsereimolke in der Praxis teilen Verff. Untersuchungen aus dem Laboratorium mit, welche, hier kurz angegeben, folgendes zeigen: Beide Prozesse, das Vorbrechen bei ca. 80° C unter Zusatz von „Sauer“ (ungefähr 20—30 l von 40—50 Säuregraden auf 1000 l Molke) und das Scheiden unter Erhitzen bis nahe Siedetemperatur und Zusatz von 5—8 l Sauer normaler Stärke auf 100 l vorgebrochene Molke stellen nur Spezialfälle der Koagulation der Eiweißstoffe durch die Wärme unter dem Einflusse bestimmter Wasserstoffionenmengen (Säurezusatz) dar. Das Vorbrechen der Molke entspricht einem Flockungsoptimum von ca. $0,45.10^{-5}$, d. h. demjenigen Optimum, welches Michaelis und Rona (Biochem. Zeitschr. Bd. 2. p. 219; Bd. 5. p. 365) für die Ausflockung des Serumglobulins gefunden haben. Da sich Serumglobulin und Laktoglobulin in chemischer Hinsicht sehr nahestehen, glauben Verff. diejenige Substanz, die beim Vorbrechen in erster Linie ausflockt, als Laktoglobulin betrachten zu dürfen. Allerdings ist ein Mitflocken eines geringen Anteils des beim Erwärmen auf 75° C gebildeten denaturierten Albumins nicht unmöglich. Die feinen ausflockenden Eiweißteilchen werden von den Fettkügelchen adsorbiert; diese umgeben sich also mit einer Eiweißhülle, m. a. W. die Fettkügelchen werden durch das koagulierende Eiweiß zusammengeleimt. Vermöge des niedrigen spezifischen Gewichtes steigt dann das fetthaltige Eiweißgerinnsel an die Oberfläche und kann durch Abschöpfen zur Herstellung von Vorbruchbutter, Molkenbutter gewonnen werden. — Der maximale Ausflockungspunkt für das Albumin der Molke, Scheiden genannt, zur Gewinnung des Ziegers und der klaren Schotte, entspricht dem von Sörensen und Jürgensen (Biochem. Zeitschr. Bd. 31. p. 397) beobachteten Denaturierungspunkte des Albumins.

Wolff (Kiel).

Schmid, Die westpreußische Käserei im Frühjahr. (Molkerei- u. Käserei-Ztg., Liegnitz. Jg. 7. 1913. p. 243; Molkereiztg., Hildesheim. Jg. 27. 1913. p. 603.)

Nach Verf. bringt gewisse Fütterungsweise, besonders die Schnitzelfütterung, speziell eingemieteter Schnitzel, für die Käsefabrikation Nachteile. Die Milch erhält eine Beschaffenheit offenbar derart, daß „die Keime, die sich in der Milch zugunsten der Käserei vorwiegend entwickeln sollen, durch den ihnen nicht zusagenden Nährboden in ihren Lebensäußerungen gehemmt sind“. Verf. hat in seiner Eigenschaft als Käserei-Instruktor wiederholt gröblich unsauberes Melken wie Milchgewinnung überhaupt beobachten können. Viel liegt, wie Verf. ebenfalls näher ausführt, an der Fabrikation. Viel zu wenig wird auch der Säuregrad der Milch beim Verkäsen in Rechnung gezogen, auf welchen Punkt ebenfalls näher eingegangen ist. Bei einem Säuregrad von 8,5—9 läßt sich am besten arbeiten und ist auch am ehesten ein normales Produkt zu erwarten (Tilsiter). Verf. spricht sich gegen die Hilfsmittel Salz und Salpeter aus und empfiehlt Gebrauch von Säuerungskulturen in geeigneter Weise. Wolff (Kiel).

Teichert, K., Über bankrote Käse. (Molkerei-Ztg., Hildesheim. Jg. 27. 1913. p. 489.)

Fehlerhafte Rotfärbungen der Rinde oder des Käseteiges entstehen 1. durch bakteriologischen, 2. chemischen, 3. Einfluß der Käseborde oder Bankungen. Die Anschauungen über die Ursachen des Bankrotwerdens der Käse sind dargelegt. Verf. untersuchte Emmentaler- und Münsterkäse, welch letztere eine mehr gelblich-grüne Färbung zeigten, die mit zunehmendem Alter in rosa, rot und braunrot überging. Eisen wurde nicht gefunden. Verf. forschte in botanisch-chemischer Richtung und kam zu folgendem Resultat:

1. Die Ursache für das Bankrotwerden der Käse liegt in dem Eindringen von Holzsaft in die Käse. Von einem Übertritt von „Farbe“ kann dabei botanisch nicht gut gesprochen werden. Es sind vielmehr die in die verholzten Membranen eingelagerten verschiedenen Stoffe — Vanillin, Koniferin, Hadromal—, welche die Holzstoffreaktionen bedingen.

2. Das Bankrotwerden wird in der Hauptsache durch den Holzsaft des Weißtannenholzes bedingt, doch scheint auch der Holzsaft des Rottannenholzes zuweilen schwache Färbungen dem Käse zu erteilen.

3. Mit Hilfe der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion kann sofort festgestellt werden, ob rote oder ähnliche Verfärbungen am Käse von den Banken herrühren — ob die Käse bankrot sind —, oder ob weitere bakteriologische oder chemische Untersuchungen zur Feststellung des Faktors notwendig werden. Wolff (Kiel).

Klose, Versuche betreffend die Herstellung von Kamembert-Käsen nach dem Mazéschen Verfahren. (Molkerei-Ztg., Hildesheim. Jahrg. 27. 1913. p. 795.)

In einem sauberen Glasgefäß (Filtrierstutzen von ungefähr 12 l Inhalt), das mit springheißem Wasser des öfteren ausgespült wurde und mit einem gut passenden Blechdeckel mit übergreifendem Rande versehen war, wurden 7 kg frisch gewonnener, 20 Minuten lang auf 85° C erhitzter Magermilch eingefüllt und auf ungefähr 30° C abgekühlt, dann wurden 25° vom „Stammferment“ zugegeben, umgerührt und das Gefäß in Wasser von 16—17° C

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

gestellt. Nach 24 Stunden sollte das auf diese Weise bereitete „Milchferment“ 42 Säuregrade (nach Soxhlet-Henkel) haben. Dieser Säuregrad wurde aber bei keinem der ausgeführten Versuche trotz mehrtägigen Stehenlassens erreicht. Von dem so erhaltenen Milchferment wurde gut filtrierter, frischer Vollmilch von bekanntem Säuregrad, die 10 Minuten lang genau auf 62° C (Wasserbad) erhitzt und dann rasch auf ungefähr 40° C abgekühlt worden war, soviel zugesetzt, daß der Säuregrad des Gemisches ungefähr 12 betrug. Das Hinzufügen der erforderlichen Menge „Reinkulturen“ (Mycoderma casei, Oidium camemberti, flüssige Rotkulturen) geschah unter strengster Beobachtung der angegebenen Vorsichtsmaßregeln und das Abmessen in der Weise, daß die für 100 l Verkäsungsmilch vorgeschriebenen Mengen gemischt und von diesem Gemisch die für die in Arbeit kommende Menge Milch nötige Anzahl Kubikzentimeter zugesetzt wurden. Dann wurde nach Vorschrift Lab und Salz zugegeben. Sobald die Käse im Reifungsraum eine genügend dichte, weiße Rasenbildung zeigten, geschah das Aufstreuen der trockenen „Rotkulturen“ (offenbar Penicillium camemberti dabei!) im Verhältnis von 10 g auf 15 kg Käse.

Es wurden dieserart fünf Versuche angestellt, gleichzeitig wurden Kamembertkäse aus der gleichen Milch in der sonst üblichen Weise hergestellt (Versuchskäse und Kontrollkäse).

Im Verlaufe der Herstellung ergaben sich außer den durch die Anwendung des Verfahrens bedingten Verschiedenheiten keine auffälligen Unterschiede. Vgl. Original. Die Kontrollkäse reiften bei allen Versuchen etwas schneller als die gleichzeitig hergestellten Versuchskäse (?). Die Reifung in den ersten drei Versuchen war in beiden Fällen ungleichmäßig, bei den beiden letzten Versuchen ließ sich ein leiser Unterschied zugunsten der Versuchskäse erkennen, „letztere schmeckten recht fein und pikant, ohne das strenge Aroma der Kontrollkäse zu zeigen.“

„Aus diesen wenigen, mit bescheidenen Apparaten ausgeführten Versuchen kann man zwar den neuen Verfahren nicht uneingeschränkt eine Überlegenheit einräumen, doch ist es mehr als wahrscheinlich, daß bei Anwendung geeigneter Sterilisierapparate ein durchaus einwandsfreies Milchferment sich wird erzielen lassen, was ja eine Grundbedingung für diese Fabrikation ist. Hierdurch wird den Reinkulturen eine ungestörtere Entwicklung gewährleistet, die noch gesteigert werden kann, wenn man dafür Sorge trägt, daß jede Käsesorte ihren besonderen Reifungsraum bekommt, in welchem sich mit der Zeit nur die diesem Käse eigenen Bakterienarten fast ausschließlich entwickeln werden. Für den normalen Verlauf der Reifung erwies sich eine gleichmäßige Temperatur von 12° C am günstigsten.“ Wolff (Kiel).

Schmid, L., Lab und Sauer in der Schweizerkäserei. (Molkerei- u. Käserei-Ztg., Liegnitz. Jahrg. 7. 1913. p. 465.)

Verf. gibt in seinen Ausführungen ein Verfahren an, um auf schnellstem und einfachstem Wege ein gutes Sauer für die Käserei zu gewinnen. Bei der Labbereitung ist es besser, eine enteiweißte Molke zu benutzen. Es ergeben sich in den praktischen Ausführungen interessante Parallelen zwischen Wissenschaft und Praxis. Verf. spricht auch über Beobachtungen betreffend Anwendung des „Kasol“ (von Steinegger und Hohl), das Vor- und Nachteile zeigen kann, und erwähnt die Verwendung von Reinkulturen bei der Labbereitung.

Wolff (Kiel).

Rogers, L. A., Berg, W. N., Potteiger, C. R. and Davis, B. J., Factors influencing the Change in Flavor in storage Butter. (U. S. Departm. of Agricult. Bureau of Animal Industry Bull. 162. 1913.)

The use of improved methods of analysis failed to show any evidence of proteolysis in butter held long periods in cold storage. Similar results were obtained when fresh buttermilk was preserved with sodium chloride to simulate butter conditions, and held in cold storage. When pepsin, trypsin and bacterial enzymes were added to similar mixtures, proteolysis was not completely inhibited.

It has been shown that butter made from pasteurized unripened cream has a higher keeping quality than butter made from unpasteurized cream. To determine if this difference was due to the growth of bacteria in the unpasteurized cream, bacteria representing the flora of the unpasteurized cream were inoculated into pasteurized cream and after a few hours incubation the cream was made into butter. These experiments gave no evidence that the bacteria were concerned in the changes in the butter.

By means of specially designed apparatus exact analysis was made of the gases contained in butter. About 10 per cent, by volume, of fresh butter is gas consisting approximately of nitrogen (by difference) 33 per cent, oxygen 20 per cent, and the remainder of gases absorbable by sodium hydroxid. The oxygen was materially less after storage.

The addition of iron to the cream even in as small an amount as one or two parts per million parts of cream has an influence on the flavor of the butter. This work gives nothing to show that the nature of the flavor is appreciably changed, but the rate of development is accelerated.

The cream may take up iron in quantities sufficient to affect the flavor from rusty cans or even from the exposed boltheads or other metal parts of the churn.

The action of copper is similar but perhaps more intense.

It was found that in milk to which 18 per cent sodium chlorid had been added there was no change in the lactose when iron was added and a current of oxygen passed through the milk for 72 hours.

A strong odor may be produced in milk by the addition of small amounts of iron salts. The ferrous salts are more active than the ferric salts.

The iodoform test is much stronger in distillates from milk containing ferrous sulfate. Author abstract.

Lubimenko et Froloff-Bagreief, Influence de la lumière sur la fermentation du mout de raisin. (Compt. Rend. Ac. Sc. Paris. T. 154. 1912. p. 226—228.)

Die Abscheidung der Kohlensäure ist bei Kultur der Hefen im Dunkeln eine schwächere. Das Verhältnis derselben und des erzeugten Alkohols ist mit Rücksicht auf die Quantitäten des verschwundenen Zuckers ein wenig vermindert. Die Kulturen der Hefen, im Lichte gezogen, erzeugten weniger Glyzerin, mehr Säuren und besonders flüchtige Säuren. Es zeigten die Versuche, daß sowohl im Lichte wie in der Dunkelheit die Quantität des Äthers im Wein als auch die Trockengewichte der Hefen die gleichen sind.

Matouschek (Wien).

Nègre, L., Bactéries thermophiles des eaux de Figuig (Algérie). (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 687—689.)

N. a isolé et caractérisé des Bactéries thermophiles provenant de sources

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

(25 à 30° C). Il décrit un Tétragène, un Staphylocoque et un Coccobacille, ces Microbes poussent bien entre 37 et 50°, mal à 22° et presque pas de 50 à 60°. Ces Microbes poussent abondamment sur gélose additionnée de NaCl à 3 et à 6 p. c. (sauf le Coccobacille). N. a aussi isolé six souches de Vibrions, poussant bien entre 37 et 50° C, mal à 22° et à 50°—60°. Ces Vibrions ont supporté de 3 à 6 p. c. NaCl (gélose), ils se différencient en plusieurs points des Vibrions cholériques. H. Kufferath (Bruxelles).

Keith, S. C., Factors influencing the Survival of Bacteria at Temperatures in the Vicinity of the freezing Point of Water. A preliminary Communication. (Science. N. Ser. Vol. 37. 1913. p. 877.)

The author began this investigation after having observed that frozen eggs kept at a temperature of 0° F. for many months still contained millions of living bacteria. He thinks that it is not longer possible to hold that either mere cold or time is in and of itself necessarily destructive of bacterial life. The experiments were carried on with the intention of harmonizing theory more clearly with experience. The author worked chiefly with B. coli. Agar cultures, 24 hours old, were employed the growth being suspended in physiological salt solution, in various dilutions of fat-free milk, in various mixtures of pure glycerin and water and in solutions of cane sugar and of commercial glucose. In some cases freezing was done in test tubes; in other cases in an ice cream freezer with the formation of an ice mush or magma.

In his summary the author states that:

1. When B. coli are frozen in Boston tap water in test tubes as solid as ice and held at —20° C. only a fraction of one percent of the original number remain alive at the end of five days. Storage of a few weeks results in complete destruction of the bacteria.

2. When B. coli are frozen in Boston tap water not solidly, but as a water ice or sherbet is frozen and held in this condition at —20° C. a large percentage remain alive for many months.

3. When B. coli are frozen in milk, pure and diluted to various degrees with water, the death rate of B. coli increases with the dilution, the largest numbers surviving in the undiluted milk and the fewest in that containing the most water.

4. When suspended in aqueous mixtures containing from 5 per cent to 42 per cent of chemically pure glycerin and held at —20° C. a very large percentage of B. coli remain alive for at least six months.

5. At + 37° C. B. coli in water or in 5 per cent to 20 per cent glycerin die rapidly, few if any remaining alive at the end of 72 hours. The death rate diminishes as the holding temperature is lowered, though it is still marked even just above 0° C. But at a temperature slightly lower a sudden change appears, the death rate at and below that point being but little, if any, greater than at —20° C.

6. By covering a 24-hour growth on agar with a sterile 10 per cent cane sugar solution, and holding at —10° C., stock cultures of B. subtilis, B. aurococcus (Staph. aureus), B. megaterium, B. fluorescens, B. Proteus and Sarcina aurantiaca have been kept in a vigorous condition for eight months.

Therefore: Low temperatures alone do not destroy bacteria. On the contrary, they appear to favor bacterial longevity doubtless by destructive

metabolism. Frozen food material, such as ice cream, milk and egg substance, favor the existence of bacteria at low temperatures, not because they are foods, but apparently because they furnish physical conditions somehow protective of the bacteria.

It seems likely that water bearing food materials as well as sugar solutions, glycerin solutions etc., freeze in such way that most of the bacteria present are extruded from the water crystals with other non-aqueous matters, including air, and lie in or among these matters without being crushed or otherwise injured. In more purely watery suspensions and above all in water itself in which the whole mass becomes solidly crystalline, they have no similar refuge but are perhaps caught and ultimately mechanically destroyed between the growing crystals. At temperatures where metabolism ceases altogether bacteria continue to exist in a state of suspended vitality similar to that exhibited by many other and higher plants which in the far north are subjected, without apparent injury, for long periods to temperatures much below the freezing point of water.

Heinemann (Chicago).

Lipman, Ch. B., The Distribution and Activities of Bacteria in Soils of the arid Region. (Univ. California Public. in Agric. Sciences. Vol. 1. 1912. p. 1—20.)

Ebenso wie die Wurzeln, dringen in ariden Böden auch die Bakterien bis in ansehnliche Tiefen vor. Elf verschiedene Böden wurden in der Weise untersucht, daß in regelmäßigen Abständen bis zu 12 Fuß Tiefe Erdproben (nach Anlegung von Gruben und Abflammung der einen glatt abgestochenen Erdwand) entnommen und die Bakterienentwicklung in Pepton-, Ammonsulfat- und Mannitlösung (nach Remys Vorschlag) geprüft wurde. Dieses Prüfungsverfahren bewährte sich auch im vorliegenden Falle recht gut.

Die ammonifizierenden Organismen waren in guten Erden auch in der untersten Schicht noch reichlich vorhanden, dagegen ergaben die mit Alkali- und Wüstenboden geimpften Kolben in diesen Fällen nur eine sehr geringe Ammoniakbildung in der Peptonlösung. Nitrifikation war in den guten Böden bis zu 5—6, ausnahmsweise bis zu 8 Fuß Tiefe nachweisbar, in schlechten Böden dagegen nur in den obersten 1—4 Fuß. Stets war aber die Salpeterbildung am lebhaftesten, wenn die Ammonlösung mit Erde aus der obersten Schicht (30 cm) geimpft wurde. Azotobacter-Entwicklung konnte bis zu 4 Fuß Tiefe nachgewiesen werden; stark war sie allerdings dann nur in einem Falle. In Alkali- und Wüstenboden fehlte Azotobacter ganz, doch wurde es, wie Verf. beiläufig bemerkt, von ihm auch in manchen fruchtbaren kalifornischen Erden vermißt. Die Annahme des Verf., Azotobacter-Befunde aus größerer als 4 Fuß-Tiefe seien bisher nicht publiziert, ist nicht ganz zutreffend[1]).

Die Untersuchungen werden fortgesetzt und sollen später ausführlich veröffentlicht werden. Löhnis (Leipzig).

Issatschenko, B. L., Někotorija dannija o bakterijach „merzloti". [= Einige Daten über die Bakterien des „Eisbodens“.] (Bull. du jard. bot. Impér. de St. Pétersbourg. XII. p. 140—154.)

---

[1]) Vergl. K. F. Kellermann, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. p. 234 (in fruchtbaren Böden Utahs Azotobacter bis zu 10 Fuß Tiefe), H. H. Waite and D. H. Squires, Nebraska Stat. Rep. Vol. 24. 1911. p. 160 (Azotobacter bis in 12 Fuß Tiefe). Der zuletzt genannte Befund wird allerdings vom Verf. auf Grund einer privaten Mitteilung zitiert.

Erdproben aus dem Amurgebiete enthalten Bakterien in gefrorenem Zustande, im Zustande „vie latente“; sie haben ihre Lebensbedingungen bei niedriger Temperatur seit längerer Zeit erhalten. Die einzelnen Proben ergaben: Eine aus 75 cm Tiefe stammende zeigte eine Bildung von Schwefelwasserstoff biogenen Charakters. Diese Bildung fand statt auch bei 3—5° C, nur war da der Prozeß ein verlangsamter. Wahrscheinlich findet die Bildung durch Bakterien unter normalen Verhältnissen bereits bei etwas über 0° statt, bei welcher Temperatur die Teilung der Bakterien eine recht langsame ist, wobei die einzelnen Zellen eine andauernde individuelle „Lebensdauer“ aufweisen. Die Aussaat auf Giltays Substanz ergab eine Reduktion der Nitrate zu Nitriten. Das gleiche zeigten die Bakterien aus einer anderen, aus 4 m Tiefe stammenden Probe. Auf Winogradskis Substrat für Clostridium Pasteurianum fand man: ein unbewegliches Stäbchen, das ein Häutchen bildete, und eine sporentragende Form (Trommelschlegelform) am Boden des Kolbens; auf Fleischpeptongelatine erschien eine gelbe Kokke (2—3 μ Diameter). In einer anderen Probe (aus 4 m Tiefe) fand man nur ein Penicillium. Die vierte Probe (aus gleicher Tiefe) ergab keine Zersetzung der Nitrate auf dem obengenannten Substrate, wohl aber auf der Oberfläche von Fleischpeptonagar einen weißen dichten Belag bei 2—3° C (jedoch nicht im Kondensationswasser). Auf dem Winogradskischen Substrate entwickelten sich 3 Formen: Stäbchen mit abgerundeten Enden, solche mit am Ende befindlichen Sporen und auch typisches Clostridium (morphologisch dem Cl. Pasteurianum ähnlich). Für dieses ist wohl auch die Möglichkeit einer Assimilation des Stickstoffes nicht ausgeschlossen. — Die Frage nach der Herkunft der Bakterien des „Eisbodens“ ist noch nicht gelöst; sie gelangten wohl nach einem längeren Zeitraume zu uns. Matouschek (Wien).

Greig-Smith, R., Contributions to our Knowledge of Soil-Fertility. No. 6. The Inactivity of Soil-Protozoa. (Proc. Linn. Soc. N. S. Wales Abstr. 1912. p. 2—3.)

Gibt man Aufschwemmungen von Bodenprotozoen, enthaltend Colpoda cucullus, zu vorher mit flüchtigen Desinfektionsstoffen (z. B Chloroform) behandelten Erdarten hinzu, so wird die Zahl der Bakterien nicht kleiner und die Cysten von Colpoda werden durch den Desinfektionsstoff nicht zerstört. Aufschwemmungen von Amoeben bringen auch keine Verminderung in der Zahl der Bakterien mit sich. Während der ersten Tage wachsen die Bakterien sehr stark darin, wenn Reinkulturen von rasch sich vermehrenden Bakterien, welche die Bakterien begleiten (z. B. Bacterium putridum), dazugegeben werden. Unfiltrierte oder durch Baumwolle filtrierte Suspensionen von Erde wirken auf die Tätigkeit der Erdprotozoen nicht ein. Matouschek (Wien).

Nègre, L., Bactéries thermophiles des sables du Sahara. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 814—816.)

L'auteur a isolé 2 Staphylocoques blancs, une Bactérie et 3 Bacilles sporulés. Il en donne succintement les caractères de culture. La limite de croissance pour les Staphylocoques se trouve à 50 et 60° C, pour Bacilles sporulés à 70° C, pour la Bactérie à 60° C. Sauf pour les Staphylocoques l'optimum

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

de température est 50° C, le minimum 32° C. Au dessous de 50° C les Bacilles et la Bactérie sont aérobies facultatifs, au dessus de cette température ils sont aérobies stricts. Tous les Microbes étudiés poussent dans les milieux salés à 3 à 6 pour 1000. La formation des spores chez les Bactéries a lieu entre 22 et 60° C, mais surtout au dessous de 50°. N. constate que ces propriétés indiquent une adaptation de la vie microbienne aux conditions désertiques. H. Kufferath (Bruxelles).

Gerlach, M., Über die Wirkung einer Durchmischung des leichteren Bodens mit Moor, Mergel, Ton und Stroh. (Die landw. Versuchs-Stat. Bd. 79/80. 1913. p. 681—699.)

Verf. berichtet über den Einfluß der Durchmischung eines leichteren Bodens mit Niederungsmoor, Wiesenmergel, Ton und Stroh auf die Höhe der Erträge. Es handelt sich um den Streifen III (Parzellen 11—15) des bakteriologischen Versuchsfeldes in Bromberg, über dessen nitrifizierende Energie Ref. eingehende Untersuchungen angestellt hat[1]). Nachdem die genannten Stoffe im Winter 1907—1908 in großen Mengen (von Moor, Mergel und Ton 9 bis 10 Proz. Stroh 400 dz pro ha) einrajolt waren, wurde die eine Hälfte des Feldes dauernd ungedüngt, die andere mit entsprechender Düngung bewirtschaftet. Die Fruchtfolge war bisher: Kartoffeln (1908), Gerste (1909), Erbsen (1910), Weizen (1910—1911), Zuckerrüben (1912).

Im Mittel sämtlicher Versuche hat die Durchmischung mit den genannten Stoffen, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, auf den ungedüngten Teilstücken sehr günstig gewirkt.

Mehrerträge in Prozenten.

	Körner (Knollen Rüben)	Trockenmasse	N
Auf den ungedüngten Teilstücken:			
Durch das Niederungsmoor	+ 46,8	+ 45,8	+ 64,6
„ den Wiesenmergel	+ 25,9	+ 27,6	+ 28,7
„ „ Ton	+ 70,5	+ 79,1	+ 82,7
„ das Stroh	+ 19,1	+ 21,0	+ 23,7
Auf den gedüngten Teilstücken:			
Durch das Niederungsmoor	+ 1,4	+ 0,8	+ 11,0
„ den Wiesenmergel	— 1.8	+ 5,4	+ 1,2
„ „ Ton	+ 5,0	+ 12,0	+ 11,7
„ das Stroh	+ 1,3	— 10,5	— 10,6

Besonders die Zugaben von Ton und Moor haben in allen Versuchsjahren bei ungedüngt beträchtliche Mehrerträge gebracht. Die Strohgabe hat auf den Ertrag der ungedüngten Parzelle in dem trockenen Jahre 1909 schädlich gewirkt, in allen anderen Jahren hat auch sie einen Mehrertrag herbeigeführt. Am günstigsten wurde der Erbsenertrag durch die Strohdüngung beeinflußt.

Auf den gedüngten Parzellen, wo also neben den genannten Zugaben alljährlich noch Kali, Phosphorsäure und Stickstoff verabreicht wnrde, war die Wirkung der Bodenmischungen erheblich schlechter und sehr unsicher. In allen Fällen sind hier gelegentlich Mindererträge aufgetreten, so beispiels-

---

[1]) Siehe z. B. Mitt. d. Kaiser Wilhelm-Inst. f. Landwirtsch. in Bromberg. Bd. 2. Heft 4. p. 388.

weise in den trockenen Jahren 1909—1911 auf den Moor- und Strohparzellen. Vogel (Bromberg).

Hutchinson, C. M., Studies in bacteriological Analysis of Indian Soils. No. 1. 1910—1911. (Memoirs of the Departm. of Agricult. in India. Bacteriol. Ser. Vol. 1. 1912. p. 1—65, w. 6 pl., 2 curves and 2 figs.)

The author describes the application of various methods of biological analysis to the study of Indian soils and criticises the use of plate counts and liquid culture media in such work, preference being given to the employment of soil media. The inhibitory effect of magnesium carbonate upon nitrification in Omelianski solution is shown to be due to loss of ammonia and to be proportional to the ammonia concentration in the solution. The effect of various methods of sterilization upon the bacterial content of soils is described with special reference to the conditions resulting in arable soils in the plains of India from the practice of hot weather ploughing; the suggestion that the increased fertility ascribed to this practice might be due to the elimination of phagocytic protozoa is criticised, and reasons given for rejecting this supposition; the possibilities of damage due to undue depletion of organic matter and nitrogen and interference with the constitution of the soil complex are pointed out. Experiments are described bearing upon the question of bacterio-toxins in soils and the increased bacterial activity consequent upon treatment with toluene; the use of the method of estimation of carbon dioxide formed in soils and artificial cultures for determination of the physiological activity of their bacterial content, and its application to special cases such as the measurement of toxicity, is described. Observations are recorded showing the effect of variation of water content upon the nitrate formation in various Indian soils; it is shown how injudicious use of irrigation water or unfortunately distributed rainfall may result in loss of nitrate to growing crops by reconversion of nitrate nitrogen to proteid form.

Special cases are mentioned, such as the wheat crop grown under irrigation, where the observed nitrogen starvation consequent on injudiciously timed watering may be supposed to be due to reduction of nitrate; another case, in which the nitrogen supply is directly affected by management of that of water, is that of the rice crop in certain irrigation tracts, where the local practice of running of the water towards the end of the growth period apparently results in supplying the plant with nitrate, which has been shown to produce favourable effects if provided during the later stages of growth. Author abstract.

Bassalik, K., Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien. I. Mitteilung. (Zeitschr. f. Gärungsphys. Bd. 2. 1912. p. 1—32.)

I. Über die Tätigkeit der Regenwürmer in Beziehung zu den Bodenbakterien (l. c. p. 1—14).

Die Regenwürmer beeinflussen in mannigfacher Weise günstig die Umsetzungen im Boden: 1. Sie verzehren eine große Menge organischer Reste (nach einem Versuch berechnet pro Jahr und Hektar 720 kg). 2. In dem kräftigen Kaumagen der Würmer werden die harten Gesteinspartikelchen zerrieben. Ein Versuch zeigte eine merkbare Abnahme der größten Korngröße zugunsten der kleineren. Durch Abnutzung der Oberfläche können auch schützende Verwitterungsdecken (z. B. Kaolin- und Tonüberzüge)

entfernt werden, so daß die Bodenpartikelchen von neuem Verwitterungseinflüssen preisgegeben werden. 3. Die Bakterienflora gerade der Würmerexkremente ist außerordentlich reich, von der des Bodens aber nur quantitativ, nicht qualitativ verschieden. (Verf. zählt 64 Arten auf; dazu kommen noch 34 isolierte, aber noch nicht identifizierte Arten.) Eine Vernichtung von denitrifizierenden Bakterien im Magen der Würmer findet nicht statt (Versuch mit Pyocyaneus).

II. Über die Zersetzung von Orthoklas durch Bodenbakterien. p. 14—32.

Orientierende Korrosionsversuche mit Bakterien auf Marmor ergaben bei Impfung mit 14 Arten nur bei 3 Arten (u. a. Bacillus vulgatus) keine Korrosion des Marmors. In Kulturen, die mit gepulvertem Orthoklas versetzt waren, war überall eine deutliche Abnahme der beigefügten Silikatmenge zu bemerken; die Bakterien waren also fähig einen Teil davon in Lösung zu bringen und zwar vermittels der produzierten Kohlensäure. Letztere wird dadurch wahrscheinlich gemacht, daß Bacillus extorqueus n. sp. (kann Oxalate allein als Kohlenstoffquelle benutzen, wird von Verf. an anderer Stelle ausführlich beschrieben), der nachweislich nur CO_2, keine organischen Säuren produziert, eine große Menge Orthoklas zu lösen vermochte. Rippel (Augustenberg).

Krüger, W. und **Wimmer, G.,** Gefäßversuche über die Wirkung verschiedener Stickstoffdünger bei Zuckerrüben. (Zeitschr. d. Ver. d. Deutsch. Zuckerind. Bd. 62. p. 73—94.)

Aus den Versuchen, welche teils in einem Sand-Torf-Gemisch, teils in der natürlichen Ackererde ausgeführt wurden, geht deutlich hervor, daß die Wirkung der Stickstoffdünger, insbesondere der einer Nitrifikation im Boden unterliegenden, auf dem sterilen Boden trotz Impfung mit Bodenaufschwemmung, bedeutend zurückbleibt. Es ergab sich:

	Verhältnis der Erntegewichte Natronsalpeter = 100						N-Ausnutzung Natronsalpeter = 100					
	Sand-Torf			Ackererde			Sand-Torf			Ackererde		
	1907	1908	Mittel	1909	1910	Mittel	1907	1908	Mittel	1909	1910	Mittel
Kalksalpeter, chem. rein	105	105	**105**	98	100	**99**	108	100	**104**	120	125	**122,5**
Kalksalpeter, techn. (Norgesalpeter)	109	110	**109,5**	99	99	**99**	107	103	**105**	118	112	**115**
Chilesalpeter	100	100	**100**	100	100	**100**	100	100	**100**	100	100	**100**
Schwefels. Ammoniak	78	57	**67,5**	104	95	**99,5**	84	56	**70**	95	99	**97**
Stickstoffkalk	19	8	**13,5**	100	92	**96**	15	6	**10,5**	90	79	**84,5**
Jauche	70	52	**61**	108	100	**104**	65	55	**60**	123	108	**115,5**
Organischer N-Dünger	—	0,7	**0,7**	78	82	**80**	—	0,5	**0,5**	14	47	**30,5**

„Augenfällig tritt in den vorstehenden Versuchen besonders der Einfluß der Bodenbeschaffenheit auf die Wirkung der verschiedenen stickstoffhaltigen Düngemittel hervor, und nicht allein die Form der Stickstoffverbindung, sondern vor allem auch der Einfluß mikrobiologischer Vorgänge im Boden spielt eine große Rolle bei der Wirkung und Ausnutzung dieser Düngemittel bei der Zuckerrübe.“ Vogel (Bromberg).

Ciocalteu, L'épandage agricole et les Microbes. (Compt. rend. Soc. de Biolog. T. 74. 1913. p. 1411—1413.)

C. choisit pour ses expériences le Haricot, qui convient parfaitement, vu la conformation et la succulence des tiges. Les cultures sont faites en pots de terre et arrosées dès la plantation des graines avec des dilutions de cultures pures en bouillon de Bacille typhique, de Bacille de la dysenterie et de Bacille pyocyanique. Les plantules sont examinées quand elles ont de 5 à 20 centimètres de hauteur. C. prélève dans l'intérieur des tissus de la plante aérienne un peu de suc végétal, qu'il ensemence en bouillon et dont il identifie les Microbes. Il indique minutieusement la technique, qui parait bonne. Dans un certain nombre d'essais, il ne décela pas de Microbes dans les tiges des plantes arrosées avec des cultures bactériennes. Un certain nombre de plantes étaient infectées. L'examen attentif des racines et des lésions expérimentales pratiquées sur les racines, ont permis à C. de dire que: "les Microbes arrivés dans le terrain de culture (pots de terre) ne pénètrent dans les plantes qu'on y cultive qu'à la faveur des pertes de substances (lésions) des parties de la plante en contact avec le terrain. Ces portes d'entrée sont malheureusement trop fréquentes." Les lésions des racines sont dues aux petits corps durs du sol. L'auteur se propose de continuer ses recherches. Rappelons que le Prof. E. Laurent, en 1899, a prouvé que des races banales de Microbes peuvent devenir virulentes pour les végétaux soumis à une alimentation spéciale. Il avait aussi été démontré que normalement les tissus végétaux sains sont stériles et dépourvus de Microbes.

H. Kufferath (Bruxelles).

Herke, A., Impfversuche mit Knöllchenbakterien an Lupinen und Seradella. (Kisérl. Közlemények. XVI. 1913. p. 10.)

Die Versuche wurden in verschiedenen, zum Teil sterilisierten Böden, in Kulturgefäßen mit Nitragin-Kühn, Nitrobakterine und Azotogen ausgeführt. Keine der Kulturen war von besonderer Wirkung. Azotogen erschien wirksamer als Nitragin, um ein geringes steigerten sie die Stickstoffsammlung und den Körnerertrag. Nitrobakterine war ohne Einfluß, Impferde gab die besten Resultate. Der Stickstoffgehalt der Körner blieb durch die Impfung unbeeinflußt. Humus- und stickstoffreicher Boden wirkte ungünstig auf die Impfung, Kalkgehalt hatte keine, Kaliphosphatdüngung eine günstige Wirkung. Die Struktur des Bodens zeigte sich ohne Einfluß auf die Impfung. Gratz (Magyaróvár).

Mickel, H., Einiges über Leguminosenimpfung. (Der Pflanzer, Daressalam. VII. 1911. p. 694—698.)

Die mit verschiedenartigem Impfstoff bei verschiedenen Leguminosenarten in Deutsch-Ost-Afrika gewonnenen Resultate haben noch zu keinem positiven Ergebnis geführt. W. Herter (Porto Alegre).

Simon, Was ist bei Ausführung einer Hülsenfrucht-Impfung besonders zu beachten? (Deutsche landw. Presse. 1913. No. 32.)

Die Wirksamkeit des nach Angaben des Verf. hergestellten Impfstoffes Azotogen darf durch zahlreiche einwandfreie Versuche als erwiesen gelten. In vielen Fällen waren die Azotogen-Erdkulturen der Naturimpferde überlegen, in anderen (auf Moorboden) brachten sie etwa die gleichen Erfolge.

wie diese. Verf. präzisiert kurz die wichtigeren, bei Verwendung von Impfkulturen zu beachtenden Maßnahmen, deren Außerachtlassung schon so manchen Mißerfolg verschuldet hat. Gegenwärtig beschäftigt sich S. mit Versuchen, welche dahin zielen, die in den Impfkulturen enthaltenen Bakterien am Verwendungsorte an die Eigenart des betreffenden Bodens anzupassen. Zu diesem Zwecke werden die Impfbakterien auf einigen kg Erde des in Frage kommenden Feldes fortgezüchtet, die so erhaltene „Impferde" kommt alsdann zur Verwendung. Dieses Verfahren hat bisher gute Resultate ergeben. Vogel (Bromberg).

Bredemann, Untersuchungen über das Bakterienimpfpräparat „Heyls concentrated Nitrogen Producer" (Composite Farmogerm). (Landw. Jahrb. Bd. 43. p. 669.)

Das von Amerika aus in den Handel gebrachte Präparat wurde einer eingehenden Prüfung hinsichtlich seiner bakteriologischen Beschaffenheit und seiner Wirkung im Vegetationsversuch unterzogen. Die fraglichen Organismen charakterisierten sich durch ihr mikroskopisches und kulturelles Verhalten als Knöllchenbakterien. Es konnten zwei kulturell unterscheidbare Formen festgestellt werden. Freilebende stickstoffsammelnde Bakterien waren in dem Präparat nicht nachzuweisen.

Auf Freilandparzellen war die Anwendung des Präparates zu Serradella von bemerkenswertem Erfolg, die Impfung von Vicia faba, Buchweizen, Senf und Hafer blieb dagegen wirkungslos. Der Serradellaertrag war gegenüber ungeimpft fast verdoppelt worden. Der betreffende Boden hatte vorher wahrscheinlich noch nie Serradella getragen.

Da dem Präparat auch eine sehr günstige Wirkung auf Nichtleguminosen nachgerühmt wird, führte Verf. eine größere Anzahl von Topfversuchen, z. T. unter Zugabe verschiedener organischer Substanzen, aus, bei welchen im ersten Versuchsjahre Senf und Buchweizen, im folgenden, ohne Wiederholung der Impfung, Gerste zum Anbau kam. Bei diesen Versuchen wurde keinerlei Erfolg durch die Anwendung des Impfmittels erzielt. Die Behauptung der Hersteller, daß der Impfstoff „auf alle Ernten wirkt und das Wachstum sowie den Nährwert aller Pflanzen erhöht", fand demnach keine Bestätigung.

Von Interesse war bei diesen Versuchen die Wirkung der zugefügten organischen Substanzen, Zucker, Heu und Casseler Braun. Der Zucker brachte im zweiten Versuchsjahre erhebliche Mehrerträge an Masse und Stickstoff, welche nach den bisherigen Erfahrungen wohl auf die geförderte Tätigkeit der stickstoffsammelnden Bakterien zurückzuführen sind. Auch der Heuzusatz hat, nachdem die schädliche Wirkung des ersten Jahres überwunden war, im zweiten Jahre außerordentlich günstige Wirkungen gezeitigt, noch günstiger als Zucker, was ja auch nicht auffallend ist, da mit dem Heu mineralische Nährstoffe und auch Stickstoff gegeben wurden. Der Zusatz von Casseler Braun hat in beiden Jahren Erntedepressionen zur Folge gehabt, die Verf. auf die physikalische Verschlechterung des Bodens durch diese sehr schwer zersetzbare Substanz zurückführt.

Endlich sollte durch Vegetationsversuche in sterilisierten Erden unter Verwendung einer größeren Anzahl von Leguminosen noch entschieden werden, um welche Arten von Knöllchenbakterien es sich in dem fraglichen Impfstoff handelt. Die erzielten Resultate sprechen dafür, daß Knöllchenbakterien der Esparsette, des Wundklees, der Pferdebohnen, Felderbsen und des Schwedenklees, sowie der Zottelwicke und des Rotklees in Heyls Nitrogen Producer nicht vorhanden sind. Dagegen schien das Präparat außer den bereits nachgewiesenen Seradellabakterien noch die Knöllchenbakterien der Luzerne und des Gelbklees zu enthalten.

Die dem Impfstoff nachgerühmten vielseitigen und weitgehenden Wirkungen sind nach dem Ausfall dieser Untersuchungen nicht vorhanden, und es ist sehr erfreulich, „daß von der von technischer Seite aus in Deutschland beabsichtigten fabrikatorischen Herstellung und Vertreibung des Präparates Abstand genommen wurde“. Vogel (Bromberg).

Gainey, P. L., The effect of toluol and CS_2 upon the microflora and fauna of the soil. (Rep. Missouri Bot. Garden. Vol. 21. 1912. p. 147—169.)

20 verschiedene Erdproben wurden mit wechselnden Mengen Toluol, Schwefelkohlenstoff, z. T. auch Chloroform behandelt. Kleine Zusätze bis 0,5 resp. 1 Proz. erhöhten die Bakterienzahl; größere Gaben wirkten zwar deprimierend, aber (entgegen E. J. Russell und H. B. Hutchinson) auf die Protozoen eher weniger als auf die Bakterien. Durch Topf- und Feldversuche fanden diese Ergebnisse ihre Bestätigung. Die gegenteiligen Befunde der beiden englischen Forscher bleiben Verf. unerklärlich; überhaupt könne der Protozoen-Theorie, von abnormen Fällen (Rieselfeldern) abgesehen, nur wenig Wahrscheinlichkeit zugebilligt werden.

Löhnis (Leipzig).

Ritter, Über die lediglich chemische Ursache sowie das nähere Wesen der schädigenden Wirkung starker Kalkungen auf Hochmoorboden. [Vorl. Mitt.] (Fühlings landw. Ztg. 1912. p. 593.)

Verf. führt die schädigenden Wirkungen starker Kalkungen auf Hochmoorboden auf rein chemische Prozesse zurück. Obwohl die Schädigungen stets mit Stickstoffverlusten verbunden sind und die höchsten Grade dann erreichen, wenn neben Kalk zugleich Salpeter dem Boden verabreicht wird, sind doch Erscheinungen der Denitrifikation für ihr Zustandekommen nicht verantwortlich zu machen.

Der Hochmoorboden zeichnet sich durch eine bemerkenswerte Keimarmut aus, die weder das schnelle Verschwinden des zugedüngten Salpeters, noch die augenfälligen pathologischen Erscheinungen an den kultivierten Pflanzen erklären könnte. Die Aktivität der Hochmoorkeime ist zudem stets eine mäßige und erfährt lediglich durch schwache Kalkungen eine Förderung. Die nachteiligen Folgen müßten daher gerade bei niederen Kalkgaben hervortreten, das ist aber nicht der Fall. Ein Teil der Moorbakterien ist zwar in Flüssigkeitskulturen zu Denitrifikation befähigt, nicht aber unter den normalen Bedingungen des Bodens selbst.

In Giltaylösungen bewirkt Hochmoorboden Nitratreduktion unter Zwischenbildung von Nitrit und Ammoniak und ohne Gasbildung auch dann, wenn antiseptische Stoffe (Phenol, Chloroform) zugegeben waren. Es kann sich hier demnach nur um Vorgänge chemischer Art handeln. Auch das Auftreten der Schädigungen bei alleiniger Zufuhr von Kalk (ohne Salpeterdüngung) macht Denitrifikation als Ursache unwahrscheinlich. Zwischen der Höhe der Kalkgaben und der Stärke ihrer schädigenden Wirkung besteht eine gewisse Proportionalität, die ebenfalls durch biologische Vorgänge schwer erklärt werden könnte.

Weitere Beobachtungen des Verf. sprechen nun dafür, daß die eintretenden Stickstoffverluste an sich keine ausreichende Erklärung für die oft sehr erheblichen Schädigungen liefern können. Von größter Bedeutung dürfte dagegen die reduzierende Kraft der Humussubstanzen sein, wenngleich auch sie nicht von ausschlaggebender Bedeutung für die fraglichen Schädigungen ist. Die eigentliche Ursache dürfte vielmehr in der Bildung bestimmter, giftig wirkender Oxydationsprodukte zu erblicken sein. Für diese Auffassung, die in einer eingehenden Arbeit noch gestützt werden soll, bringt Verf. eine Reihe von Gründen und Erwägungen bei.

Vogel (Bromberg).

Densch, Zur Frage der schädlichen Wirkung zu starker Kalkgaben auf Hochmoor. (Landw. Jahrb. Bd. 44. 1913. p. 331.)

Die Schädigungen, welche starke Kalkdüngungen auf Hochmoorboden hervorrufen, erfahren durch gleichzeitige Salpeterdüngung eine bemerkenswerte Steigerung. In solchen Fällen treten Vergiftungserscheinungen auf, die in engem Zusammenhang mit Stickstoffumsetzungen im Boden zu stehen scheinen. Daher wurde das Schicksal des Salpeters in gekalkten und ungekalkten Böden verfolgt, um Anhaltspunkte für den Zusammenhang zwischen Kalk- und Salpeterdüngung einerseits und dem Auftreten von Ertragsrückgängen andererseits aufzufinden.

Zu den Versuchen diente ein ausgesprochener sogen. Heidehumus, welcher unter verschiedenen Bedingungen mit Kalk- und Nitratzusätzen versehen wurde. Neben bemerkenswerten Verlusten an Salpeterstickstoff in den gekalkten und den unbehandelten Proben fiel das Auftreten von Nitrit in sämtlichen gekalkten Böden auf, während die Filtrate der nicht mit Kalk versetzten Proben entweder überhaupt keine Nitritreaktion ergaben oder dieses höchstens in Spuren vermuten ließen.

Verf. hat zunächst die Art der auftretenden Stickstoffverluste näher zu ergründen gesucht. Es ergab sich, daß der Stickstoff in elementarer Form entweicht, und daß weder von einer Festlegung in Eiweißform, noch von einer Verflüchtigung etwa gebildeten Ammoniaks die Rede sein kann. Der Kalk beeinflußte die Salpeterverluste nur unerheblich, bewirkte aber wiederum die Bildung von Nitrit.

Es war nun zu entscheiden, ob es sich bei den geschilderten Reaktionen um Vorgänge chemischer oder bakteriologischer Art handelt, und entsprechende Versuche in sterilisierten Erden ließen erkennen, daß sowohl die Stickstoffverluste, wie auch die Nitritbildung auf rein chemische Ursachen zurückzuführen sind.

Von Bedeutung für eine Erklärung der auf gekalktem Hochmoor auftretenden Pflanzenschädigungen schien besonders die Bildung und, wie nachgewiesen wurde, die lange Haltbarkeit des Nitrits in solchen Bodenproben zu sein. In den mit einer 10 g Trockensubstanz entsprechenden Menge Moorboden beschickten Kölbchen hatten sich 3—4 mg Nitrit gebildet, eine Menge, welche ausreichend ist, um die fraglichen Schädigungen zu erklären.

Die Sickerverluste an Salpeter waren auf dem gekalkten Hochmoor größer als auf dem rohen, bei der Ammoniakauswaschung war das umgekehrte der Fall. Auch bei diesen, den praktischen Verhältnissen näher kommenden Versuchen war in den gekalkten Proben Nitrit in beträchtlichen Mengen entstanden.

Verf. bemerkt, daß er das Auftreten von salpetriger Säure auch im freien Hochmooracker auf Grund dieser Laboratoriumsversuche nicht mit Bestimmtheit behaupten, und sie auch im Falle ihres Auftretens nicht als die sichere und einzige Ursache für die Kalkschädigung hinstellen wolle. Er hält es jedoch für sehr wahrscheinlich, daß Nitrit auch draußen im Hochmoorboden eine wichtige Rolle spielt, zumal sich alle Beobachtungen über Kalkschädigungen dadurch zwanglos erklären lassen. Die Bildung von Nitrit wird demnach für die bisweilen beobachteten Schädigungen mindestens mit verantwortlich zu machen sein. Neben Nitrit entstehen wahrscheinlich noch Nitro- oder Nitrosoverbindungen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch diese für die Schädigung des Pflanzenwachstums in Frage kommen.

Vogel (Bromberg).

Boullanger, E. et Dugardin, M., Mécanisme de l'action fertilisante du soufre. (Compt. rend. hebd. de l'Acad. Paris. T. 155. 1912. p. 327—329.)

Zur Erklärung der mehrfach konstatierten, ertragssteigernden Wirkung einer mäßigen Schwefelbeidüngung wurden einige bakteriologische Versuchsreihen in Gang gebracht. Die Ammoniakbildung wurde sowohl in Peptonlösung (durch 10—30 mg Schwefelblüte pro 200 ccm 5-proz. Peptonlösung) wie in Erde (20 mg Schwefel zu 500 g Erde) bedeutend erhöht. Auch die Nitrifikation ließ eine Förderung erkennen. Dagegen war eine Steigerung der Tätigkeit stickstofffixierender Mikroben nicht wahrzunehmen. Ein ausreichender Vorrat an Nährstoffen im Boden ist demnach eine unerläßliche Vorbedingung für eine günstige Wirkung des Schwefels.

Löhnis (Leipzig).

Hinze, G., Beiträge zur Kenntnis der farblosen Schwefelbakterien. (Ber. d. Deutsch. botan. Gesellsch. 1913. p. 189—202.)

Verf. beshreibt zwei unter Beggiatoa mirabilis aufgefundene Schwefelorganismen. 1. Monas Mülleri Warming, ein Organismus, „der morphologisch zu den Flagellaten, physiologisch zu den Schwefelbakterien in nahen Beziehungen steht". Die von Engler beschriebene Monas Mülleri ist nicht identisch damit. Migula stellt Monas Mülleri zu Unrecht zu Achromatium Schewiakoff als Achromatium Mülleri (Warming) Mig. Die von sehr zarter Membran umgebenen Zellen sind eiförmig, mit polarem Bau. Die Schwefeleinschlüsse sind meist auf einen Pol zusammengedrängt. „Schwefelpol" kann jeder der beiden Pole sein, aber bei einem Individuum und sogar dessen Nachkommen ist er konstant. An einem Pol findet sich ein bläschenartiger Kern mit sich sehr stark tingierendem Nukleolus. Die Zellteilung beginnt am hinteren (spitzeren) Pol mit einer Einschnürung, die immer tiefer wird. Am vorderen (stumpferen) Pol finden sich ein oder mehrere hinfällige Geißeln, von denen Verf. nur einmal Reste sichtbar machen konnte. Die Bewegung ist außerordentlich schnell, zickzackförmig mit wechselnder Längsrotation. 2. Thiovulum nov. gen. Die Zellen sind ellipsoid, manchmal etwas zugespitzt, zuweilen auf einer Seite etwas abgeflacht. Es kommen zwei Formen vor: Th. maius Hinze und Th. minus Hinze. Die Zellen haben eine scharf umgrenzte Membran; die Schwefeltropfen sind verschiedenartig gelagert; es findet sich ferner ein unbekannter Inhaltskörper, wahrscheinlich ein Reservestoff, rundliche oder ovale, mattgrünliche Gebilde; Volutin ist es nicht. Die Bewegung ist sehr lebhaft aber nicht so unregelmäßig wie bei Monas; Längsrotation. Die Begeißelung ist peritrich. Die Teilung geht senkrecht zur Längsachse durch allseitige Einschnürung vor sich.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Ob der eingeschlossene Schwefel ein Stoffwechselprodukt darstellt, konnte Verf. bisher noch nicht beweisen, vermutet es aber durch Analogieschluß mit Beggiatoa mirabilis und dem Aufenthalt in H_2S-haltigem Wasser.

Die natürliche Verteilung der drei zusammenlebenden Organismen ist folgende: Th. maius an der Oberfläche in Perlschnurnetzen, Th. minus etwas tiefer in Flocken, M. Mülleri von der Oberfläche bis zum Schlick herab in Platten.

Zum Schluß macht Verf. noch einige Bemerkungen über die „Beggiatoenkeime“ Cohns und Warmings, über den Unterschied von Thiophysa und Thiovulum und über Achromatium oxaliferum, worüber auf das Original verwiesen sei.

Rippel (Augustenberg).

Rossi, G. e Ciaccia, M., Novo contributo allo studio della decomposizione dei vegetali. (S.-A. a. Rendic. d. Soc. Chim. Ital. Vol. 5. 1911. 3 pp.)

Rossi, G. e Ciaccia, M., Studii critici e sperimentali sui fermenti pectici anaerobici. (S.-A. a. Festschr. f. A. Celli.) Roma (G. Bertero) 1912. p. 325—348. 1 Taf.

Die Frage nach den pektinlösenden Eigenschaften der obligat anaëroben Amylobakterien wurde einer genaueren Prüfung unterworfen. Unter streng anaëroben Bedingungen konnten Kulturen von Amylobakterien, deren Reinheit durch Einzellkultur gesichert wurde, unversehrte, d. h. keimfreie, aber lebendige Pflanzenfragmente angreifen. Trotzdem konnte eine echte, pektinlösende Wirkung nicht festgestellt werden, weil Kartoffelstücke schnell, Hanfstengel gar nicht verrottet wurden. Eine von den drei untersuchten echten Amylobacter-Rassen war auf beiden Materialien völlig unwirksam, obwohl sie aus verrotteten Hanfstengeln stammte.

Außerdem wurden andersartige anaërobe Bakterien gefunden, welche lebende Kartoffelstücke schnell zerstörten, aber keine pektinlösende Wirkung entfalteten.

Die Eigenschaft, Granulose- oder Amyloreaktion zu geben, hängt mit pektin- oder zelluloselösenden Eigenschaften, d. h. mit der Fähigkeit, Pflanzenfragmente anzugreifen, ebenso wenig wie mit der Buttersäureausscheidung zusammen.

Im ganzen dürfte nach diesen Untersuchungen das pektinlösende Vermögen der echten, obligat anaëroben Amylobakterien, überhaupt die Rostwirkung anaërober Bakterien sehr fraglich sein. Pantanelli (Rom).

Anonyme, Note sur la préparation du Manioc amer (Manihot utilissima, Pohl) dans la région de Katalo-Kombe (Congo belge). (Bull. agric. du Congo Belge. T. 3. 1912. p. 657.)

Dans cette note, il est indiqué que les nègres font subir au manioc une fermentation dans l'eau. La préparation indigène du manioc fermenté est décrite. H. Kufferath (Bruxelles).

Chalot, C., Contribution à l'étude sur la fermentation du Cacao. (L'Agricult. prat. des pays chauds. Ministère des Colonies. Paris 1913. p. 76—78.)

C. conseille d'ensemencer la cuve renfermant les graines à faire fermenter avec les raclures de la surface des cabosses fraiches. A la surface des cabosses (fruit) on trouve le Saccharomyces Theobromae d'Axel Preyer. Lorsque la fermentation se produit, il y a élévation de la température à 45° C.; la fermentation est terminée après 4 à 6 jours; à ce moment la température de la cuve diminue. Il faut retirer alors les graines de cacao. Le brunissement du cacao serait du à une oxydase, la Théobromase (Dr. Lambert). C. indique, d'après le Dr. Lambert, la façon de mener la fermentation du Cacao. Kufferath (Bruxelles).

Mayer, Gg., Die Anforderungen an Fleischbüchsenkonserven. (Wien. med. Wochenschr. 1913. p. 115—120.)

Vorliegende Arbeit gibt den Inhalt eines 1912 in Münster i. W. auf der Naturforscher- und Ärzteversammlung gehaltenen Vortrages wieder. In der Einleitung erinnern historische Angaben u. a. an die außerordentlich wichtige Rolle, welche die Erbswurst 1870/71 spielte, dann folgen Angaben über gemachte Fortschritte in diesen wichtigen, für weite Kreise unentbehrlichen Präparaten. Eigene Versuche des Verf. über die ausreichende Sterilisation bei 400 g-Dosen ergaben, daß eine ¾ Stunde währende Einwirkung von 110—115°, verbunden mit einer direkt anschließenden ¼stündigen Einwirkung von 120,5° C noch nicht zur sicheren Sporenabtötung genügt. Für die allgemeine Praxis ist eine Temperatur von 116° im Inneren der Büchsen zu empfehlen; dies geschieht bei einem Druck von einer Atmosphäre gleich 120,5° erst nach 60—70 Min. im Inneren von 400—600 g-Dosen. Verf. hält es für wünschenswert, daß die Höhe der zur Sterilisation verwendeten Temperatur und womöglich auch deren Dauer in deutlich lesbarer Schrift auf den Büchsen angebracht wird. Sehr genaue, für Produzenten äußerst wichtige Vorschläge für eine einwandfreie Sterilisationsmethode sind auf den pp. 106—118 niedergelegt. Wir ersehen, daß 1875 noch 20 Proz. der österreichischen Armeekonserven verdorben waren, um 1900 waren 70—80 Proz. der französischen Konserven bakteriell zersetzt und rund 200 Mann der französischen Armee erkrankten jährlich am Genusse minderwertiger Konserven, wie auch ferner sehr minderwertig die Lieferungen amerikanischer Konservenfabriken im spanisch-amerikanischen Kriege waren. Demgegenüber sind die in italienischen und besonders in den deutschen Armeekonservenfabriken dargestellten Erzeugnisse hervorzuheben. Nach Mayer rechnet man bei letzteren höchstens auf einen Ausfall von 1—2 pro Mille, welcher sich außerdem schon im ersten Jahre der Lagerung herausstellt. Sehr wenig vertrauenerweckend sind die meisten der in der Privatindustrie hergestellten großen Büchsen, welche meist Amerika zu 10, 25 und mehr Portionen liefert; die mit 25 Portionen sind so gut wie stets keimhaltig.

Die in dichten Büchsen vorkommenden Bakterien sind zumeist Sporenbildner, nur in undichten Büchsen finden sich Bakterien, welche lediglich vegetative Formen aufweisen. — Die frühere Anschauung, Konservenvergiftungen als Zinnvergiftungen infolge partieller Lösung des Zinnbelages anzusehen, hat man aufgegeben, seitdem man durch Schusters Untersuchungen den äußerst minimalen Gehalt hieran bei Fleischkonserven erkannt hat. Bei Gemüsekonserven können allerdings 100, ja mehrere 100 mmg pro Kilo in Lösung gehen und diese Mengen können akute, wenn auch nur leichte Verdauungsstörungen bedingen. Leider besteht vorläufig kein Mittel zur Abhaltung der Zinnlösung und die bei Fruchtkonserven gebrauchten inneren Lackierungen halten höchstens 3—6 Monate. Über die Büchsenkonserven mit Fischen und sonstigen Seebewohnern äußert sich der Verf. auf den pp. 119—120; er spricht sich gegen die meist sehr fragwürdige Hausarbeit aus und empfiehlt die Produkte gut geleiteter Großindustrie, welche die wohl gereinigten, eben gefangenen Fische in siedendes Provençeröl einbettet. Wird nicht siedendes Öl verwendet, so stellen sich Bakterienzersetzungen ein und der Inhalt zeigt ein eigentümlich rötlich oder fluoreszierendes Aussehen, bedingt durch vegetative Bakterienfloren, das Fleisch selbst wird schmierig.

Als Ergebnis seiner Erfahrungen stellt Verf. fest, daß einerseits gut geleitete Konservenfabriken einwandfreie Ware zum Verbrauche bringen können, anderseits aber muß den gestellten Forderungen allgemein genügt werden, wenn die Konserven in unserer Lebensführung die ihnen zukommende Rolle ausfüllen sollen. Es muß Sache der Industrie sein, die jetzigen Verfahren noch immer weiter auszubauen; vor allen Dingen aber soll sie versuchen, einwandlose, haltbare und billige, auch für den Massengenuß brauchbare Fischkonserven zu fertigen. Rullmann (Darmstadt).

Rosam, A., Eine einfache Methode zur Beurteilung des Gärungsvermögens verschiedener Futterstoffe, der Milch und des Galaktaseenzyms der Milch. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 193.)

Zur Untersuchung von Futterstoffen und Milch auf Mengen gefährlicher gärungsfähiger Mikroorganismen empfiehlt Verf. die sehr einfache „Waltersche Gärungsprobe“ mit einer Abänderung dahin, daß die Probegläschen mit Kautschukstopfen versehen werden, durch die eine Glasröhre durchläuft, deren unteres Ende ungefähr 5 cm in das Probeglas hinabreicht und deren oberes Ende ca. 30—50 cm herausragt. Man kann hohe, schmale Erlmeyerkölbchen oder große Reagenzgläser verwenden. Die Gläschen werden einige Stunden bei 35—40° C aufbewahrt. Eine Gärung innerhalb 3 St. bis zur Höhe von 30 cm in der Glasröhre ($^{30}/_{3} = 10 = 100$ Proz.) zugrunde gelegt, wurden folgende Zahlen gefunden: Futterrübe: 43—60 Proz., frische Futterschnitzel 30—50 Proz., saure Futterschnitzel 10—18 Proz., trockene Schnitzel 25—40 Proz., frisches unreines Krautblatt 40—60 Proz., Kleie 50—70 Proz., Heu 30—45 Proz., frische Treber 0,5—5 Proz., unreines Streustroh 65 Proz., Fäkalien 50—70 Proz., und Milch 4—20 Proz. Auf 50 ccm Inhalt des Probegläschens entfielen 1—5 g des zu prüfenden Stoffes; wenn es sich um die Beurteilung der Gärungswirkung von Futterstoffen auf Milch handelte, so wurde anstatt des Wassers sterilisierte Milch verwendet.

Nach Verf. ist diese Methode auch zur Ermittlung der Katalasezahl der Milch geeignet. Wolff (Kiel).

Sani, G., Azione del fosfato monocalcico sulla conservazione dei foraggi verdi. (Rendic. Accad. Lincei. Ser. 5. Vol. 21. 1912. II. Sem. p. 108—112.)

Mit 300 g Monocalciumphosphat pro Dz. bestreutes Kleegras liefert ein vorzügliches, an verdauliches Eiweiß und an Stärke reicheres, an Fett ärmeres als das ohne Phosphatzusatz eingesäuerte Kleefutter. Die Temperatur steigt während des Einsäuerns sehr wenig, die Schimmelbildung ist sehr gering, so daß Farbe, Beschaffenheit und Stärkegehalt beinahe wie im lebendigen Zustande erhalten bleiben. Eiweißverdauung, Gewichtsverlust und Säurebildung waren viel geringer als bei den Kontrollen.

Pantanelli (Rom).

Schneider, E., Schimmelpilze in Leinkuchen. (Molkerei-Ztg., Hildesheim. Jg. 27. 1913. p. 677; Milchw. Centralbl. Jg. 42. 1913. p. 313.)

Verf. macht Mitteilung aus der Praxis, wonach verschimmeltes Leinkuchenmehl, das an sich als verdorben nicht immer leicht zu erkennen ist, den Tieren (Rindvieh) allmählich die Kraft nimmt. Dabei nehmen die Tiere derartiges Futter nicht ungern und zeigen unverminderte Freßlust. Der Kot ist auffallend bröckelig, aber nicht trocken; hieraus ist andererseits der Schluß auf schimmelhaltiges Ölkuchenmehl zu machen. Wolff (Kiel).

Wehmer, C., Pilzverzuckerung und Amyloverfahren. (Chemiker-Ztg. 1912. p. 116).

Brennereien, welche das „Amyloverfahren" anwenden, haben oft bis 16 Stück der bis 1500 hl messenden Verzuckerungs- und Gärapparate im Betrieb. Malz wird nicht mehr verwendet. Der unter bakteriologischen Vorsichtsmaßregeln gezogene und eingesäte Pilz (Rhizopus Delemar) vollführt in wenigen Tagen die Verzuckerung des zuvor gedämpften stärkehaltigen Materials (meist Mais); eine Reinkultur einer Alkoholhefe bewirkt die Vergärung. Namentlich in den Tropen findet das Verfahren eine immense Verbreitung, was Rückwirkungen auf die Spiritusmärkte der einzelnen Staaten zur Folge hat. Infektionen sind völlig ausgeschlossen, da die Verzuckerung und Gärung in ganz steriler Lösung stattfinden.

Matouschek (Wien).

Wehmer, C., Über Zitronensäuregärung. (Chemiker-Ztg. 1912. p. 115).

Diejenigen Pilze, welche die Zitronensäuregärung des Zuckers verursachen, sind sehr unempfindlich gegen starke Konzentrationen von freien Säuren überhaupt. Verf. isoliert daher mittels saurer Flüssigkeiten diese Pilze, auf letzteren entwickeln sich leicht die Mycelien aus Keimen, die eventuell aus der Luft hineinfallen. Es wird eine Parallele gezogen zwischen dem Auftreten organischer Säuren bei den Phanerogamen und bei den Pilzen (Folgen einer unvollständigen Oxydation von Kohlehydraten). So die Zitronensäurebildung und die von Oxalsäure durch Aspergillus niger. Freie Weinsäure und Apfelsäure sind im Stoffwechsel der Pilze noch nicht beobachtet worden. — Wie kommt es nun zu der unvollständigen Verbrennung und der dadurch bewirkten temporären Ansammlung der Säure? Mazé und Andere glauben, daß relativer Mangel an N-Verbindungen in der Gärflüssigkeit anstoßgebend für die Gärung sein soll. Verf. glaubt aber, daß noch andere Momente in Frage kommen, und prüfte deshalb einige Faktoren: 1. Kontinuierlicher Luftstrom, behufs Erzielung stets genügenden Sauerstoffs, durch die Gärflüssigkeit geleitet. Doch kam es zu keiner völligen Zersetzung der entstandenen Zitronensäure. Durch die stete Bewegung der Lösung wuchs der Pilz schlecht, daher wird die Weiteroxydation höchstens verzögert. 2. Absperrung der Luft erstickte den Pilz. 3. Stickstoffverbindungen (Salmiak, Ammoniumphosphat und -Nitrat, Pepton, je 1,2 g auf 200 ccm Flüssigkeit) brachte reichliche Zitratabscheidung ein, bei Salmiak aber traten Gärung und die gesamte Abscheidung merklich später ein, die Ausbeute war geringer (4 Proz. gegen 35 Proz.). Bohnenabkochung gab kein gutes Resultat. Anorganischer N-Stickstoff erwies sich als durchaus günstig. Die dem Pilze gebotene Stickstoffmenge war ohne erheblichen Einfluß.

Im Gegensatz zu den Angaben der Literatur konnte Verf. Abscheidung von Calciumcitrat bereits am Schlusse der ersten Woche nachweisen. Er entwirft folgendes Bild: Nach 11 Tagen ergaben sich aus 75 g Zucker etwa 44 g Zitrat, in einem anderen Falle nach 14 Tagen aus 200 g rund 83 g Zitrat, durchwegs über 40 Proz. des Zuckers. Diese Versuche hatten durchschnittlich etwa 20 Proz. Zucker bei ½—1 Proz. anorganischer Salzlösung. Das Maximum der Gärung fällt mit üppiger Pilzentwicklung zusammen, ja sie beginnt schon bei der Deckenbildung. Versuche in viel größerem Maßstab ergaben 65 Proz. Calciumcitrat; würde der gebotene Zucker von dem Pilze ausschließlich in Zitronensäure übergeführt, so müßte man natürlich ganz andere Zahlen erwarten, z. B. entsprechen 100 g Zucker 170 Proz. Zitrat. Die tatsächliche Ausbeute ist nur etwa ¼ der theoretischen. Die Möglichkeit, diese Zahlen zugunsten der Säure zu verschieben, wäre denkbar. Die besondere Art des Pilzes spielt hier eine ähnlich wichtige Rolle wie bei der Milchsäuregärung. Mazés Versuche mit Citromyces-Arten, die auch aus Alkohol oder Glyzerin Zitronensäure bilden, müssen noch genauer verfolgt werden; Verf. fand reduzierende Substanzen in den Flüssigkeiten nicht. Mit Buchner spricht sich auch Verf. für eine direkte Entstehung aus dem Zucker selbst — etwa auf dem Wege über die Parasaccharinsäure — aus. Matouschek (Wien).

Bainier, G. et **Sartory, A.,** Nouvelles recherches sur les Citromyces. — Etude de six Citromyces nouveaux. (Bull. Soc. Myc. France. T. 29. 1913. p. 137—161, pl. 4—5.)

Verff. beschreiben das morphologische und biologische Verhalten folgender neuer Arten:

Citromyces minutus, C. ramosus, C. Cesiae, C. Musae, C. cyaneus.

Bei diesen Arten findet, mit Ausnahme der ersten, eine Pigmentbildung statt. C. ramosus sezerniert ein schwach rosafarbiges Pigment. Bei C. ceriae und C. Musae ist das Pigment rot; C. cyaneus sezerniert zweierlei Pigmente, das Mycelium ein rotes und die Konidien ein grünlich gelbes Pigment. Lakon (Tharandt).

Neville, Allen, Linseed Mucilage. (Journ. of Agricult. Science. Vol. 5. 1913. p. 113—128.)

The first part of the paper deals with the preparation and chemical properties of linseed mucilage and show that linseed mucilage is a carbohydrate body showing all the characteristics of the hydrated cellulose, it gives on hydrolysis both hexose and pentose sugars in large quantity.

The action of enzymes and of bacteria on mucilage was studied. Under laboratory conditions the mucilage is unattacked by the digestive enzymes, and even when fed to a non-ruminant animal 75 per cent can be shown to pass through unchanged. Laboratory experiments indicate that the mucilage is attacked by intestinal bacteria, and, in ruminants especially, largely broken up in this way, with the evolution of gases and certain volatile acids among other products. The experiments on this point consisted in the inoculation of dilute solutions of mucilage with a small quantity of fresh caecum contents

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

from a cow and incubation of the mixture at 38° C. In the first experiment the contents of the flask became strongly acid and fermentation stopped. In the next experiment calcium carbonate was added to the nutrient solution. The gas evolved contained about 90 per cent carbon dioxide, 6 per cent methane and the remainder oxygen and nitrogen. From the contents of the flask about 7 per cent of the weight of the mucilage taken could be distilled over as volatile acids when heated with dilute sulphuric acid and in this distillate butyric and acetic acids were recognised. Attempts to use the mucilage for plate cultures were not successful. Golding (Reading).

Audouard, L'impureté du sel alimentaire. (Journ. des soc. agric. du Brabant Hainaut. 1913. p. 142—143.)

A indique les impuretés du sel alimentaire et signale spécialement l'existence de nombreux microbes pathogènes et autres qui peuvent produire des inconvénients et des dangers. Cet article est extrait des Annales des Falsifications. H. Kufferath (Bruxelles).

Buchner, Eduard und **Langheld, Kurt,** Notiz zur alkoholischen Gärung des Zuckers. (Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. 46. 1913. p. 1972.)

Bei Zusatz von primärem und sekundärem Natriumphosphat läßt sich bei der Zuckergärung durch Hefe oder Hefesaft Acetaldehyd nachweisen. Kontrollversuche sollen noch ausgeführt werden.

Hermann Strauß (Berlin).

Knudson, Lewis, Tannic Acid Fermentation. I and II. (Journ. Biol. Chem. Vol. 14. 1913. p. 159—184, 185—202.)

The first part of the Article I deals with the toxicity of tannic acid for various fungi, the second part with a comparison of the organism Aspergillus niger and Penicillium sp. in the fermentation of tannic acid and the third part deals with the conditions and influence of various factors on the fermentation process. The second article deals with the effect of nutrition on the production of the enzym tannase. A short description of the Penicillium sp. is given in Article I.

The history of the work done up to date in this interesting fermentation is dealt with in an exhaustive manner. The culture solution used is a modification of Czapek's solution by Richards. The toxicity of tannic acid was tested on 28 different fungi. The results show that Aspergillus niger and Penicillium sp. are best adapted for tannic acid fermentation. Some of the results are as follows: Aspergillus niger is a more vigorous fermentative organism than Penicillium sp. Fermentation is more rapid in gall-nut infusion than in a synthetic solution containing tannic acid as source of carbon. Addition of 5 per cent sugar did not protect the gallic acid, but increased the growth. Addition of 10 per cent sugar protected gallic acid entirely. When gallic acid and cane sugar to the extent of 5,5 per cent and 10 per cent resp. were offered together, the cane sugar was elected and the gallic acid left in the culture solution. Fermentation can take place under anaerobic conditions. The economical methods are: a) those in which growth occurs under aerobic conditions and the tannic acid is supplemented by cane sugar; or b) those, in which tannic acid alone is used and the supply of oxygen limited to a small amount. The presence of 10 per cent cane sugar does not inhibit the secretion of the enzym tannase by Aspergillus niger, but it does seem to inhibit to some extent the secretion of the tannase by Penicillium sp. The enzym is secreted into the culture solution by submersed mycelium as well as by surface growth. There is no evidence that tannic acid is used directly; but the evidence seems to indicate that tannic acid is first transformed into gallic acid and the gallic acid then untilized.

The second report on the Nutrition and Tannase Production leads the author to the following conclusions: There is a progressive increase of tannase in the two organisms Aspergillus niger and Penicillium sp. with increased concentration of tannic acid in Czapek's solution containing 10 per cent sugar. In a full nutrient solution containing 2 per cent tannic acid as source of carbon the addition of cane sugar decreases the quantity of the tannase produced by the organism. Aspergillus niger produces more tannase or a more active tannase per unit weight than Penicillium sp. The production of tannase in Aspergillus niger, Penicillium sp. and Penicillium rugulosum is stimulated by tannic acid and gallic acid, only, and the former is more effective than the latter. There is a progressive increase of tannase in Aspergillus niger with increased concentration of gallic in a nutrient solution containing 10 per cent sugar.

P. G. Heinemann (Chicago).

McBeth, I. G., and Scales, F. M., The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. (U. S. Departm. of Agricult. Bureau of Plant Industry Bull. 266. 1913.)

This is a progress report upon the destruction of cellulose by bacteria and by filamentous fungi. Five new species of cellulose-destroying bacteria are described:

Bacterium fimi, Bacterium liquatum, Bacillus bibulus, Pseudomonas subcretus and Bacillus cytaseus.

The descriptions of the cultural characteristics of the cellulose-destroying bacteria have been simplified as much as possible by selecting media which would show the salient characteristics of the bacteria, and reporting only those characters which remained fairly constant through three successive sets of cultures. Contrary to the general belief that soil fungi are largely confined to acid soils, the writers have found that when cellulose in the form of filter paper is added the cellulose-dissolving forms multiply with great rapidity in alkaline soils also. Obviously the cellulose-dissolving activities of filamentous fungi are important in soils. Their action is rapid, and many species occur in abundance. The following is a partial list of cellulose-dissolving fungi:

Penicillium expansum (Link) Thom, P. pinophilum Hedg., P. claviforme Bainier, P. luteum Zukal, P. roseum Link, P. stoloniferum Thom, P. rugulosum Thom, P. africanum Doebelt, Penicillium n. sp., Penicillium n. sp., Aspergillus nidulans Eidam, A. fumigatus Fres., A. flavus Link, Gliocladium viride Matr., Trichoderma lignorum (Tode) Harz, Cephalothecium roseum Cda., Haplographium echinatum (Riv.) Sacc., Sporotrichum radicicolum A. Zimm., S. thebaicum Ehrenb., S. sporulosum Sacc., and Fusarium sp. undet.

Kellerman (Washington).

Mütterlein, C., Studien über die Zersetzung der Zellulose im Dünger und Boden. [Inaug.-Dissert.] Leipzig 1913.

In der auf Veranlassung von Löhnis ausgeführten Arbeit gibt Verf.

zunächst einen Überblick über die bisher vorliegenden Untersuchungen, wobei die grundlegenden Beobachtungen van Itersons, Omelianskis, Pringsheims u. a. besonders eingehend berücksichtigt werden. Bei den eigenen Untersuchungen über die im Dünger und Boden wirksamen Zellulosezersetzer wurden Anhäufungsversuche unter Verwendung von Nährlösungen verschiedener Art ausgeführt; als Impfmaterialien dienten frische Gartenerde, frischer und gerotteter Rindviehdünger, ein Gemisch von Erde und frischem Dünger und in einem Falle auch Panseninhalt. Je nach den gewählten Bedingungen gelangte Verf. zu charakteristischen Gruppen von zellulosezersetzenden Organismen, die sich vielfach durch typische Pigmentbildungen auszeichneten.

Unterschieden wurde zwischen der innerhalb der Kulturflüssigkeit selbst sich abspielenden Zersetzung, der an der Flüssigkeitsgrenze eintretenden und der oberhalb der Flüssigkeit, also unter ganz aëroben Bedingungen, sich vollziehenden Lösung des verwendeten Papiers.

Zur Isolierung der in Betracht kommenden Mikroorganismen diente, nachdem sich ein unter Verwendung von fein gemahlenem Papierrohstoff hergestellter „Papiermehlagar“ wenig bewährt hatte, ein Papieragar, welcher durch Zugabe von 1½ Proz. Agar zu den verschiedenen mineralischen Nährlösungen erhalten wurde. Die infizierte Agarschicht bedeckte Verf. nach dem Erstarren mit einer Scheibe sterilisierten Filtrierpapiers. Auf den so hergestellten Gußkulturen kamen Mikroben zur Entwicklung, die auch nach Abimpfung wieder zur Zellulosezersetzung befähigt waren. Im ganzen wurden 21 Organismen gewonnen, von welchen nur einer ein Bacterium vorstellte; die übrigen 20 gehörten zu den Pilzen und Aktinomyceten. Alle Arten wuchsen aërob, und es hatte sich im Verlaufe der Untersuchung gezeigt, daß sowohl in den Roh- wie in den Reinkulturen die Zellulose im allgemeinen kräftiger unter aëroben als unter anaëroben Bedingungen angegriffen wurde. Verf. bemerkt ferner zu seinen Befunden:

Die in einigen Kulturen aufgetretenen dunklen Verfärbungen des Papiers sprechen dafür, daß die Zellulose bei ihrer Zersetzung Humussubstanzen zu liefern vermag.

Ein hoher Feuchtigkeitsgehalt ist für eine intensive Zelluloselösung unbedingtes Erfordernis. Besonders einige in Erde durchgeführte Umsetzungsversuche lassen die fördernde Wirkung eines ausreichenden Wassergehaltes deutlich erkennen.

Der modifizierende Einfluß der Nährlösung trat namentlich bei einigen mit Reinkulturen duschgeführten Versuchen scharf hervor. Während verschiedene der betreffenden Pilze in Petrischalen (nach van Itersons Methode) nur kümmerlich gediehen, zersetzten sie in Omelianski-Lösung das Papier recht kräftig. Verhältnismäßig am lebhaftesten war die Zelluloselösung in der von van Iterson angegebenen Salpeterlösung.

Eine beträchtliche Förderung erfuhr die Zellulosezersetzung durch Steigerung der Temperatur.

Die Fähigkeit zur Zelluloselösung ist nicht auf eine eng umgrenzte Gruppe von Mikroben beschränkt, sondern vielen Organismen eigentümlich; besonders verbreitet scheint sie unter den Pilzen zu sein.

Während bis jetzt nur anaërobe thermophile Zellulosezersetzer bekannt waren, geht aus den Untersuchungen hervor, daß thermophile Zelluloselösung auch durch aërobe Organismen eingeleitet werden kann.

Während zelluloselösende Pilze leicht in Reinkultur zu gewinnen sind,

bereitet die Isolierung zellulosezersetzender Bakterien große Schwierigkeiten.
Vogel (Bromberg).

Sartory, A., Sur la présence d'Aspergillus fumigatus Fresenius sur des cigares. (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 74. 1913. p. 650—651.)

S. a identifié par culture cet Aspergillus, qui est pathogène. D'autres auteurs l'avaient déjà signalés sur les feuilles de tabac.
H. Kufferath (Bruxelles).

Jensen, Hj. et Ott de Vries, Onderzoekingen over tobak der Vorstenlanden. Verslag over h. j. 1911. Batavia 1912.

Der I. Teil ist von Jensen verfaßt und handelt über folgende hier interessierende Punkte:

A. Phytophthora (Lanasziekte, Bibitziekte). Für die kleinen Lanaspflanzen verwende man transportierbare, zerlegbare kleinere Öfen. Schon die jungen toten Pflanzen müssen verbrannt werden. 95 Proz. der Impfungen mit Auflegen von kranken Pflanzenteilchen auf den Wurzelhals gelangen im Freien. Die Orte der abgestorbenen Pflanzen desinfiziere man mit Schwefelkohlenstoff. Die Bodendesinfektion mit Kaliumpermanganat oder mit Kalk und Ammoniumsulfat brachte keinen deutlichen Erfolg. Phytophthora Nicotianae ist die alleinige Ursache der Lanaskrankheit auf den Feldern; bei der Bibitkrankheit wirkt noch ein dem Pythium Debaryanum ähnlicher Pilz mit.

B. Bezüglich der Gründüngung: Zwischen Tabak wurde Desmodium stipulaceum und Crotaloria retusa ausgesät; nur erstere scheint sich zu bewähren.

C. Zur Bekämpfung der Mosaikkrankheit: Es ist nicht gelungen, durch Selektion mosaikfreie Pflanzen zu erziehen. Die Infektion mit dem Safte mosaikkranker Pflanzen wirkte stets erkrankend.

D. Einfluß der Wurzel der Setzlinge auf den weiteren Wuchs der Pflanze: Beim Ausziehen der Setzlinge wird vom Wurzelsystem nur wenig mitherausgerissen. Es zeigte sich, daß der Hauptwurzel keine so große Wichtigkeit zukommt wie den Seitenwurzeln. Wurden erstere ganz entfernt, so blieben die Pflanzen nicht zurück; beraubte man die Setzlinge aller Wurzeln, so gingen sie zwar nicht zugrunde, blieben aber später stark im Wachstume zurück.

E. Thrips-Krankheit: Diese Insekten sind nach Verf. wohl die Ursache der blasigen Auftreibung und Kräuselung der Blätter. Vielleicht ist dies auch bei der Krankheit „Krupuk" der Fall.

Der II. Teil, von Vries verfaßt, kommt hier außer Betracht.
Matouschek (Wien).

Buchner, P., Studien an intrazellularen Symbionten. I. Die intrazellularen Symbionten der Hemipteren. 116 pp. u. 12 Taf. Jena (G. Fischer) 1912. Preis: ℳ 18,—.

Verf. schildert in höchst übersichtlicher Weise im ersten Abschnitt seiner Arbeit den bisherigen Stand unserer Kenntnis vom symbiontischen Vorkommen pflanzlicher Organismen innerhalb der Gewebe des Insektenkörpers. Dieser 37 Seiten umfassende Teil der Arbeit berücksichtigt die gesamte hierher gehörige Aphiden-, Cocciden-, Aleurodiden-, Psylliden-Cicadiden-, Blattiden-, Hymenopteren-, Coleopteren-, und Lepidopteren-Literatur, also lauter den Pflanzenpathologen interessierende Gruppen.

Mit einer praktisch besonders wichtigen, den Hemipteren, beschäftigen sich die eigenen, vorwiegend cytologischen und anatomischen Untersuchungen des Verf., die wegen des Umfanges der Detailbeschreibungen und vor allem ohne die Tafeln nicht gut kurz referiert werden können (p. 38—77).

Aus dem letzten, einer vergleichenden Betrachtung unserer nunmehr vorliegenden gesamten Erfahrungen über intrazellulare Symbionten bei Insekten gewidmeten Kapitel (p. 77—108) interessiert die Leser dieser Zeitschrift besonders der Abschnitt, in dem Verf. die systematische Stellung der Symbionten behandelt. Es werden nicht weniger als 32 systematisch genauer charakterisierbare, z. T. vom Verf. neu beschriebene Pilzarten behandelt und abgebildet. Wolff (Bromberg).

Weyland, H., Zur Ernährungsphysiologie mykotropher Pflanzen (Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 51. 1912. p. 1—80).

1. Es gelang dem Verf., den Harnstoff sicher nachzuweisen in verschiedenen obligaten Mykotrophen (z. B. Ophrys muscifera, Listera ovata, bei Epipactis, Neottia, Gymnadenia, Polygala). In den Wurzeln wurde der meiste Harnstoff gefunden (als Nitrat und Oxalat identifiziert). Sonst verhalten sich bezüglich dieses Stoffes die oben genannten chlorophyllarmen Orchideen wie ihre chlorophyllhaltigen Verwandten.

2. Stets fehlte der Harnstoff aber bei einer Zahl echter Autotrophen: Isatis, Sisymbrium, Chelidonium, Sedum usw., ebenso bei Aspidium und Equisetum, wenn ersteres auf kalkhaltigem Boden, letzteres auf humusfreiem Boden gedieh. Wuchsen diese zwei Pflanzenarten aber auf humusreichem bzw. sumpfigem Boden, so konnte Verf. den Harnstoff nachweisen. Es ist also wohl in der Pflanze selbst die Möglichkeit einer Harnstoffaufnahme aus dem Boden oder ein ähnlicher Prozeß gegeben.

3. Fakultative Mykotrophen verhielten sich verschiedenartig: Harnstoff fehlt z. B. in Pirola minor, Vaccinium Myrtillus, V. Vitis idaea; bei Gentiana, Asarum, Pulmonaria, Pulsatilla usw. findet sich mitunter dieser Stoff vor. Andere Genera oder Arten wiesen oft nur Ammoniumsalze auf.

4. Bei den Pilzen Coprinus stellaris und C. diaphanus fand Verf. den Harnstoff, wahrscheinlich dürfte er auch bei anderen Pilzarten vorhanden sein. Die Wurzelknöllchen der Leguminosen zeigten keine Harnstoffreaktion.

5. Die Beweise für die Ansicht, daß die wichtigste Aufgabe des Wurzelpilzes die Stickstoffassimilation ist: Wurde Ophrys muscifera und Listera ovata dunkel gestellt, so war Harnstoff nach 8 Tagen weder in den Wurzeln noch in den Blättern nachzuweisen; trotz der Verringerung des Zuckergehaltes wurde der Harnstoff verarbeitet. Dagegen waren die Ausscheidungen von Ammoniumsalz jetzt in größerer Menge zu konstatieren. Wurden diverse Pflanzenarten kurz über der Wurzel abgeschnitten und in Wasser oder in verdünnte Dextroselösung gestellt und mäßigem Lichte ausgesetzt, so war nach 2 Tagen jeglicher Harnstoff verschwunden und durch Ammoniumsalze ersetzt. Daher geht die Verarbeitung des erstgenannten Stoffes recht rasch vor sich. Der Harnstoff ist also ein Stoffwechselprodukt des Wurzelpilzes, welches den betreffenden Pflanzenarten nur zugute kommt.

6. Interessant sind die Angaben über die Assimilation der Nährsalze:

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Mykotrophe Pflanzen weisen eine geringe Wasserdurchströmung auf; diese wird durch den Wurzelpilz zum Teil wenigstens,, aufgehoben, da er Kalium und Phosphor in konzentrierter Lösung und Form in das Gewebe der Pflanze einführt. Das Calcium aber nehmen die Pflanzen direkt aus dem Boden, dann, wenn sie auf kalkhaltigem Boden wachsen. Diese Ansichten stimmen überein mit denen, die Stahl seinerzeit angedeutet hat.

Matouschek (Wien).

Klebahn, H., Grundzüge der allgemeinen Phytopathologie. Berlin (Gebr. Bornträger) 1912.

Das vorliegende Buch umfaßt 147 Seiten mit 74 Abbildungen; der Text mußte infolgedessen knapp gehalten werden. Die parasitären Krankheiten nehmen etwa die Hälfte ein, der übrige Teil behandelt andere Krankheitsursachen, z. B. die chemischen und physikalischen Verhältnisse des Bodens, die klimatischen und meteorologischen Faktoren, die Störungen durch die menschlichen Kulturbetriebe und den Einfluß des Wassers; weitere Abschnitte besprechen die Wunden, die enzymatischen Krankheiten und die Bildungsabweichungen und den Schluß machen Literaturverzeichnis und Sachregister.

Den Abschnitt über die parasitären Pilze bearbeitete der durch zahlreiche ausgezeichnete Uredineen- und Ascomycetenforschungen bekannte Verf. zur Hauptsache nach seinen eigenen Erfahrungen, was auch äußerlich schon dadurch zum Ausdruck kommt, daß die Hälfte der beigefügten Abbildungen Klebahns früheren Publikationen entnommen wurde.

Die folgenden kritischen Aussetzungen, die der Ref. leider zu machen genötigt ist, wären weggeblieben, wenn der Titel der vorliegenden Schrift anstatt „Grundzüge der allgemeinen Phytopathologie" etwa „Ausgewählte Kapitel aus der Phytopathologie" oder ähnlich lauten würde. Während z. B. den Pilzen als Krankheitserregern (ohne Pilzgallen) 45½ Seiten gewidmet sind, erhielten die Insekten (ohne Tiergallen) nur deren 2½; vom Standpunkt des Mykologen aus betrachtet, mag diese ungleiche Verteilung des Stoffes nicht unverständlich sein, dem allgemein phytopathologischen Charakter des Buches wird sie aber nicht gerecht. Daran ändert die Erklärung des Verf. nichts, daß er von den Insekten mit beißenden Mundteilen nur die zu erwähnen habe, „die so klein sind, daß sie sich der oberflächlichen Untersuchung entziehen, oder die so verborgen in der Pflanze leben, daß man nur den krankhaften Zustand, nicht aber gleichzeitig den Urheber sieht". (Die holzbewohnenden Agaricaceen und Polyporaceen wurden doch auch behandelt, trotzdem sich ihre Fruchtkörper selbst der „oberflächlichsten Untersuchung" nicht entziehen!) „Das Abfressen von Pflanzenteilen durch Tiere kann man nicht Krankheit nennen, wenngleich ein geschwächter Zustand daraus entstehen kann; aber zwischen dem Abgrasen einer Weide durch Vieh und dem Wirken winziger Maden in Achsenorganen, das zum Absterben der ganzen Pflanze führen kann, ist nur ein gradueller Unterschied." Genau mit dem gleichen Recht oder Unrecht könnte morgen ein vorwiegend entomologischer Autor eines phytopathologischen Lehrbuches den Insekten 45½ und den Pilzen nur 2½ Seiten zuweisen, mit der Begründung, daß in der Wirkung der meisten parasitischen Pilze auf die Nährpflanzen zur Hauptsache doch nur „graduelle Unterschiede" auftreten. Wozu dann überhaupt noch eine allgemeine Phytopathologie!

So kommt es, daß diese „Grundzüge" z. B. den Kahlfraß an Bäumen, die holzbewohnenden Käfer- und Schmetterlingslarven und all ihre direkten

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

und indirekten schädlichen Wirkungen, die Wurmstichigkeit der Früchte, den Generations- und Wirtswechsel bei Pflanzenläusen usw. mit Stillschweigen übergehen, der Reblaus und den Schildläusen zusammen ein halbes Dutzend Zeilen widmen, dann aber doch plötzlich für einige eigene nebensächliche Beobachtungen des Autors über das Auftreten von Wanzen aus der Gattung Lygus an Gewächshauspflanzen noch den doppelten Raum findet.

Verf. behandelt im vorliegenden Buche nur die „reine Pathologie“ und läßt die „angewandte Phytopathologie“ absichtlich beiseite. Abgesehen davon, daß seine Einteilung anfechtbar erscheint, leidet der Wert des Buches sehr unter der übergroßen Scheu vor den „praktischen“ Momenten. Kein Wort über Wirkung und Anwendung kupferhaltiger Spritzflüssigkeiten, nichts von Rebenveredlung oder von modernen biologischen Bekämpfungsversuchen. Das sind doch sicher auch phytopathologische Fragen von allgemeinem wissenschaftlichen Interesse! Schneider-Orelli (Wädenswil).

Köck, G., Die wichtigsten Kartoffelkrankheiten und ihre Erkennung auf dem Felde. (Monatsh. f. Landwirtsch. Jg. 6. 1913. p. 211.)

Der Zweck der Zusammenstellung ist, die wichtigsten Krankheiten der Kartoffelpflanze nach ihrem makroskopischen Bilde, also nach dem Habitusbild der kranken Pflanze, so zu beschreiben, daß die Erkennung einer bestimmten Krankheit auf dem Felde auch dem Laien leicht und sicher gelingt. Es sind nämlich in den meisten Fällen die äußerlich sichtbaren Krankheitssymptome so auffällig, daß bei Kenntnis derselben die Bestimmung der Krankheit nicht allzu schwer fällt. Beschrieben werden: Die Krautfäule, auch „Kartoffelkrankheit“ bezeichnet (durch Phytophthora infestans), die Blattbräune, auch „Dürrfleckenkrankheit“ genannt (durch Alternaria Solani), die „Kräuselkrankheit“ (eine erbliche, nicht parasitäre, physiologische Krankheit, deren Ursache noch unbekannt ist; ähnliche krankhafte Erscheinungen, die aber mit der Krankheit nichts zu tun haben, können auch durch tierische Parasiten hervorgerufen werden), die Blattrollkrankheit (mit der Kräuselkrankheit zu einem gewissen Grad ähnlich, mit ihr aber nicht zu verwechseln; Ursache scheint eine parasitäre, durch einen in den Gefäßen der erkrankten Pflanzen lebenden Pilz aus der Gruppe Fusarium hervorgerufene Krankheit zu sein), die Schwarzbeinigkeit (durch einen Spaltpilz Bacillus phytophthorus) und die Gelbsucht (eine physiologische, nicht parasitäre Krankheit; Ursache unbekannt).

Die Kartoffelpflanze ist auch den Angriffen zahlreicher tierischer Feinde ausgesetzt, deren Beschädigungen im allgemeinen für die Kartoffelkultur aber keine einschneidende Bedeutung haben, wie z. B. die Beschädigungen des Krautes durch Blattläuse, verschiedene Wanzenarten, Anzahl von Käferlarven und Schmetterlingsraupen. Stift (Wien).

Ursprung, A., Über das exzentrische Dickenwachstum an Wurzelkrümmungen und über die Erklärungsversuche des exzentrischen Dickenwachstums. (Beihefte z. bot. Centralbl. XXIX. Abt. I. 1912. p. 159—218, m. 1 Fig.)

Das Untersuchungsmaterial stammt zum größten Teile von Bäumen her, die an steilen Abhängen wuchsen und bei denen ein Teil der Wurzeln streckenweise seit Jahren bloßgelegt war. An Krümmungsstellen der Wurzeln von Picea excelsa ist das Dickenwachstum ein exzentrisches und der stärkere Zuwachs liegt auf der konkaven Seite. Bei Fagus silvatica

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

war in 155 Fällen das Dickenwachstum auf der konkaven, in einem Falle auf der konvexen Seite gefördert. Die wenigen Wurzeln, die von anderen Bäumen stammten, zeigten stets den stärkeren Zuwachs auf der konkaven Seite. Starke Exzentrizitäten sind oft mit starken Krümmungen verbunden; ganz schwache Biegungen besitzen meist auch nur schwache Exzentrizitäten. Die Hyponastie ist bei Picea deutlicher ausgesprochen als die Epinastie bei Fagus. Zur Erklärung des exzentrischen Dickenwachstums werden die Längenspannungen in erster Linie herbeigezogen. Bald sind sie reine Zugspannungen oder reine Druckspannungen, gewöhnlich sind beide kombiniert. Letztere werden gründlich besprochen und zwar ihr gemeinsames Vorkommen mit exzentrischem Wachstum, ihre Beziehungen zu dem Sinn der Exzentrizität und ihre Beziehungen zu den anatomischen Differenzen der antagonistischen Seiten. Verf. erläutert ferner die Frage, ob sich die Wirkung der kombinierten Längsspannungen aus der Wirkung der reinen Zug- und Druckspannungen ableiten läßt. Auch die Bedeutung anderer Faktoren kommt zur Betrachtung.

Besser als mit den kausalmechanischen Erklärungsversuchen steht es mit der teleologischen Erklärung: In Fällen von exzentrischem Dickenwachstum findet man fast immer den Querschnitt elliptisch und die große Achse in die Krümmungsebene oder die Richtung der biegenden Kraft eingestellt. Durch die Verlegung des stärkeren Dickenwachstums auf die konkave Seite der Wurzelkrümmung wird eine Ausgleichung derselben bewirkt und dadurch an Material gespart, an Stämmen und Ästen außerdem durch Reduktion des Hebelarmes die Bruchgefahr vermindert. Die Exzentrizität ist in der Mitte der Krümmung am stärksten. Ganz gleich verhält es sich mit der Förderung des vertikalen Astdurchmessers und der Abnahme der Exzentrizität von der Basis nach der Spitze eines horizontalen Astes. Hat das Längenwachstum sein Ende erreicht oder ist die Krümmung gewaltsam fixiert, so ist die Aufhebung derselben nur noch durch exzentrisches Dickenwachstum möglich, was auch erfolgt. Das Vorkommen von Rotholz auf der Druckseite und von Weißholz auf der Zugseite läßt sich mit den mechanischen Eigenschaften dieser Holzarten in Zusammenhang bringen (Hinweis auf die Forschungen Sonntags). Dagegen bleibt es dunkel, wozu die Koniferen mehr Rotholz bilden als Weißholz. Ist die Ober(= Zug)-Seite bedeutend widerstandsfähiger gegen Zug als die Unter(= Druck-)Seite gegen Druck, so erscheint Hyponastie am zweckmäßigsten (Picea). Besitzt dagegen die Unter(= Druck-)Seite eine bedeutend größere Widerstandsfähigkeit gegen Druck als die Ober(= Zug-)Seite gegen Zug, so erscheint Epinastie am zweckmäßigsten (Eriodendron). In beiden Fällen wird die geringere Qualität des Gewebes durch eine größere Quantität ersetzt. Sonderbarerweise bilden Bretterwurzeln auf ihrer auf Druck beanspruchten Oberseite ein Holz, das in anatomischer Beziehung wenig widerstandsfähig gegen Druck ist. Es handelt sich also wohl um eine Verstärkung der Stammbasis des betreffenden Baumes. Doch liegen noch keine Untersuchungen darüber vor, ob bei einem Sturme die Stammbasis so stark beansprucht werden kann, daß sie ohne Bretterwurzeln bricht. Die Hauptfunktion der Bretterwurzeln ist also eine andere, vorderhand daher noch fragliche. Verständlich sind die großen dünnwandigen Zellen auf der Konkavseite gekrümmter Wurzelpartien, um eben eine rasche Ausgleichung der Krümmung zu erwirken. Matouschek (Wien).

Untersuchungsmethoden, Instrumente etc.

Frouin, A., Le milieu de culture d'acides aminés complets pour microorganismes. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 1238—1239.)

F. fait quelques remarques à propos d'une note de Dalimier et Langereaux (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 1081) sur un milieu nutritif à base du produit commercial dénommé "opsine". F. constate que ce milieu n'a pas de composition définie et insiste sur la nécessité d'indiquer la nature des albumines hydrolysées servant comme milieu de culture, ces indications donnant des renseignements utiles sur l'interprétation des résultats de culture. H. Kufferath (Bruxelles).

Küster, Ernst, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen für den Gebrauch in zoologischen, botanischen, medizinischen und landwirtschaftlichen Laboratorien. 2. Aufl. 8°. IV + 218 pp. Leipzig (B. G. Teubner) 1913. Geb. 8,60 *M*

Ein Handbuch für den Biologen, das nicht nur die Kultur der Bakterien, sondern auch der Mxyomyceten, Algen und Pilze und anderseits der Protozoen und Flagellaten gründlich auf Grund eigener Erfahrungen bei gründlichster Berücksichtigung der Literatur behandelt. Der allgemeine Teil behandelt das Wasser und Glas, ihre Verunreinigungen und deren chemische Wirkungen auf die Organismen, alle wichtigeren flüssigen und festen Nährböden, die Anlage von Kulturen, das Sterilisieren, die Isolierung und Reinzucht, das Impfen, der Einfluß der Luft, diverser Gasarten der Temperatur und von Giften usw. auf die Kultur, die Bedeutung der Stoffwechselprodukte, die mikrobiochemische Analyse und Konservierung der Kulturen. Der spezielle Teil ist den eingangs erwähnten Organismen gewidmet; der Anhang macht darauf aufmerksam, daß die erläuterten Methoden auch beim Studium höherer Lebewesen und ihrer Zellenphysiologie wertvoll werden können.

Matouschek (Wien).

Rochaix, A., Nouveau milieu végétal pour cultures microbiennes (Agar au jus de carotte). (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 74. 1913. p. 604—606.)

Des carottes (Daucus carota) sont pressées; à 800 cc. de jus de carotte on ajoute 200 cc. d'eau. On ajoute de la gélose de 30 ou 35 pour 1000 du mélange eau-jus de carotte. On stérilise à 115° après clarification et alcalinisation. Beaucoup de bactéries poussent très bien sur ce milieu qui convient spécialement pour les Champignons, ce milieu est dépourvu de peptone.

H. Kufferath (Bruxelles).

Whipple, George H., The 37° Bacterial Count. (Americ. Journ. of Public Health. Vol. 3. 1913. p. 36.)

The much discussed question of what medium to use and what temperature and period of incubation is most practical for water examination is again brought forward in this paper. The present rule of the Committee of the American Public Health Association for Sanitary Water Analysis is the use of agar and the plates are to be incubated at 37° for 24 hours. This is a sudden change from gelatin at room temperature and, as the author claims, liable to produce confusion. He discusses the pros and cons of the two methods and shows by a series of experiments that the 20° incubation yields higher results than the 37° incubation. The conclusion

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

arrived at is, that a sudden change like this is not advisable, especially since the tendency of bacteriologists is towards the use of synthetic media, which again will necessitate a change of methods in the near future.

P. G. Heinemann (Chicago).

Beauverie, J., Les méthodes de la biométrique appliquées à l'étude des levures. (Compt. Rend. Soc. Biol. T. 72. 1912. p. 142—143.)

Cryptococcus Lesieurii Beauv. zeigt folgende Durchmesser in der Kultur auf Karotten nach 6 Tagen bei 25° C: 2, 3, 4, 5, 6, 6,5 μ. Die entsprechende Häufigkeit der Fälle ist folgende: 3, 14, 45, 29, 8, 2. Die Charaktere der Krümmung erleichtern die Identifizierung.

Matouschek (Wien).

Euler, Hans u. Johansson, David, Über die Reaktionsphasen der alkoholischen Gärung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85. 1913. p. 192.)

Verff. haben die Geltung der Gärungsgleichung von Harden und Young: $2\,C_6\,H_{12}\,O_6 + 2\,PO_4\,HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2\,H_6O + 2\,H_2O + C_6\,H_{10}\,O_4(PO_4\,R_2)_2$ für Trockenhefe, Hefeextrakt und lebende Hefe quantitativ untersucht, da Trockenhefe Glukose nicht ohne Vorbehandlung mit lebender Hefe vergor oder mit Natriumphosphat veresterte. Offenbar muß hier noch eine nur in der lebenden Hefe vorhandene Hexose vorbereitend wirken. Bei den Versuchen wurde die Kohlensäure volumetrisch bestimmt und das freie Phosphat mit Magnesiamischung gefällt. Während nun die Gärungsgleichung insofern gilt, als die entwickelte Menge CO_2 und das gebundene Phosphat im Verhältnis 1 zueinander stehen, ist über die für die Gärungsphasen wirksamen Enzyme noch nicht völlige Klarheit geschaffen. Ein Überschuß an Phosphat hemmt die CO_2-Entwicklung, doch wirkt ein Zusatz von Fruktose dieser Hemmung entgegen. Außer der Bildung von Hexosediphosphat ist noch ein Triosemonophosphat nachweisbar. Harden und Young zeigten, daß der Kohlehydratphosphorsäureester während der Gärung hydrolysiert wird. Doch läßt sich diese Hydrolyse, wie aus den Versuchen der Verff. hervorgeht, durch Antiseptica, speziell Toluol, stark hemmen.

Hermann Strauß (Berlin).

Fromme, Bakteriologische Trinkwasseruntersuchungen und Colibazillen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 74. 1913. p. 74—108.)

In vorliegender Arbeit sind die Resultate einer großen Anzahl von Trinkwasseruntersuchungen niedergelegt und ersehen wir schon eingangs, daß das Ergebnis einer Keimzählung allein häufig nur bedingt verwertbar ist; es stellt sich das Erfordernis heraus, neben der im wesentlichen quantitativen Methode der Keimzählung einen weiteren Maßstab für die bakteriologische Wasserbeurteilung in qualitativer Hinsicht aufzustellen. Von den Methoden, die sich mit dem Nachweis bestimmter Bakterien im Wasser befassen, hat die Untersuchung auf Colibakterien große Verbreitung gefunden. Da dieselben spezifische Darmbewohner sind, so ist mit deren sicherer Nachweisung eine Verschmutzung des betreffenden Wassers durch Eintritt fäkalischer Massen bewiesen. Den einleitenden Worten schließt Verf. die Art der Probeentnahme und deren Zusendung in das bakteriologische Laboratorium an, woraus zu ersehen ist, daß sowohl Proben von Einzelanlagen (Quellen, Kessel- und Röhrenbrunnen) als auch von Sammelanlagen zur Untersuchung gelangten. Der vorliegende Bericht bringt keine ausgesuchten

Fälle, sondern es sind „laufende Untersuchungen", deren Ergebnisse für die Beurteilung des gegenwärtigen Zustandes der Anlage dienen sollten.

Abteilung I bringt die zentrale Versorgung mit Flußwasser nach Sandfiltration. Das betr. Wasser entstammt einem Flußlaufe, der die Abwässer zahlreicher Ortschaften aufnimmt und schon auf Grund der Besichtigung konnte eine sicher wirkende Reinigung durch das überlastete Filterwerk nicht angenommen werden, so daß der verhältnismäßig häufige Colibefund nach halbjährlicher Untersuchung nicht überraschen konnte.

Dann folgen Angaben in Abteilung II über Quellen, von welchen sieben Gruppen zur Untersuchung gelangten. Die Einzelergebnisse wollen aus den Tabellen ersehen werden; aus Gruppe 2 sei hervorgehoben, daß die nachgewiesenen Colikeime dadurch ihren Eingang fanden, daß die eine Quelle ungefaßt war und von den Zuflüssen zwei aus der Nähe eines Wohnhauses mit Dunggrube kamen, so daß hierdurch der Coligehalt erklärlich war. Die in Abteilung II ausgeführten Quellenuntersuchungen ergaben, daß Proben mit Colibazillen zumeist aus Quellen stammen, deren Anlagen sehr wohl die Möglichkeit oberflächlicher Zuflüsse zulassen. Als einwandfrei bezeichnete Anlagen blieben dauernd colibazillenfrei.

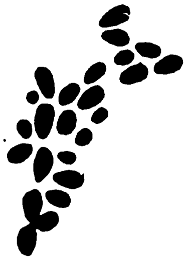
Abteilung III bringt die Kesselbrunnen; auch hier sind erläuternde Tabellen beigegeben. Fanden sich hier keine Colibazillen, dann sind auch bei deren Anlage keine Mängel zutage getreten und höhere Keimzahlen haben sich zumeist aus einer Keimanreicherung infolge geringerer Brunnenbenutzung erklären lassen. Wurden aber Colibazillen gefunden, dann traten auch die Gründe für deren Eindringen, meist Undichtigkeit, zutage.

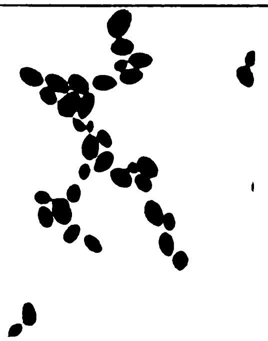
Abteilung III a bespricht die Röhrenbrunnen; diejenigen, in deren Proben Colibazillen konstatiert wurden, sind von den negativ befundenen getrennt. Meistens sind bei den Einzelprotokollen die Anlagen der Röhrenbrunnen besprochen, welche Coli enthielten (Tabelle VI); häufig ließen sich bei deren Vorhandensein mehr oder weniger wahrscheinliche Erklärungen hierfür abgeben, aber nicht immer war die wünschenswerte Gründlichkeit zur Begründung möglich. In Tabelle VII sind die als colifrei befundenen Röhrenbrunnen zusammengestellt; der größte Teil von ihnen wurde nur einmal untersucht, da das bakteriologische Ergebnis günstig war. Von 260 Proben erwiesen sich in diesem Abschnitt 76 Proz. als colibazillenfrei.

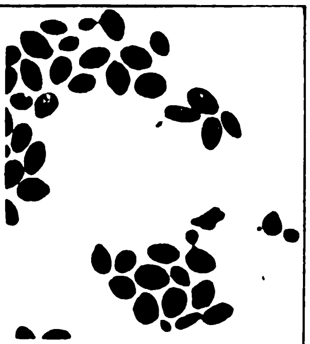
Abteilung III b berichtet über Abessinierbrunnen. Die untersuchten Brunnen stehen fast durchweg auf Wiesengelände und reichen bis 4 und 6 m tief in den Boden. Infolge seltener Benutzung ist die ermittelte hohe Keimzahl auf diesen fördernden Umstand zurückzuführen; Colikeime konnten durch den Schlitz für den Pumpenschwengel und hierdurch ermöglichten Zutritt von Oberflächenwasser eingeführt werden. Bei diesen Versuchen ermittelte Verf. elf colifreie und sechs colihaltige Abessinierbrunnen.

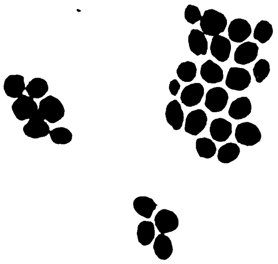
Den Schluß bildet in Abteilung IV die zentrale Versorgung mit Grundwasser. Zwei verschiedene Anlagen erhalten bei der Versorgung der betreffenden Städte ihr Wasser aus dem Rheintal aus einer Entfernung von 1—2 Kilometer in einer Anzahl Röhrenbrunnen, welches bei einer Tiefe von 9—12 m in ein Hochreservoir gedrückt wird. Die wasserliefernden Schichten sind von einer dünnen Letteschicht überlagert, auf wel-

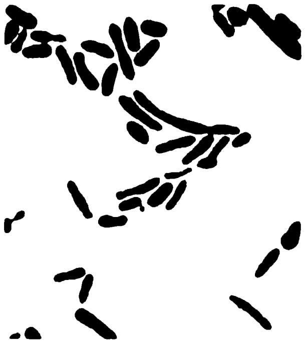
Centralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. 39. ***Edwards,*** *Cheddar Cheese.* *Plate I.*

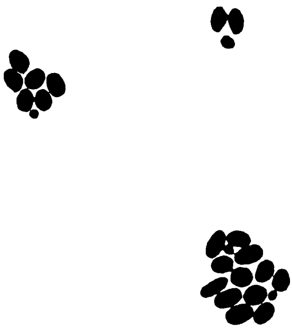

A.2.

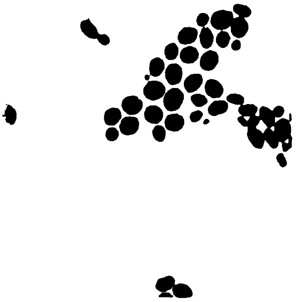

A.5.

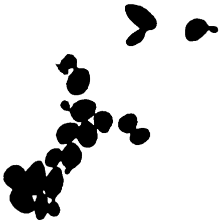

B.2.

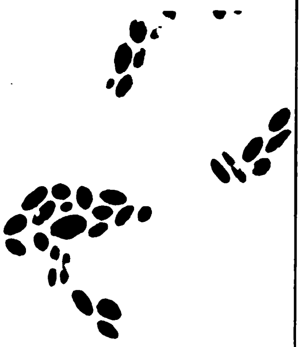

B.4.

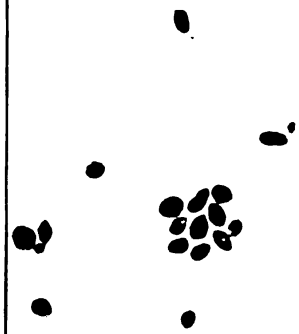

D.1.

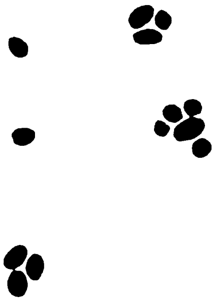

J.1.

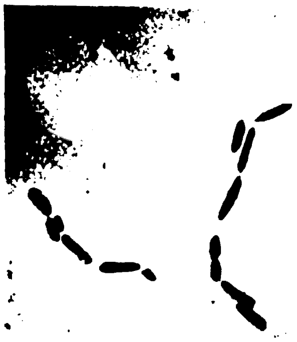

J.2.


K.1.


K.3.


O.1.


P.1.


X.2.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

cher Kies und Sandschichten ruhen. Der Grundwasserstrom geht zur Rheinlinie, so daß Zuflüsse aus dem Rhein für die Anreicherung des Grundwassers nicht in Frage kommen. Die Seiten 102—106 enthalten die Protokolle und die Tabellen X und XI bringen die Gesamtübersicht.

Die Ergebnisse seiner Versuche stellt Verf. in folgenden Sätzen zusammen:

1. Während eines 1½jährigen Zeitraumes wurden 747 Wasseruntersuchungen aus 179 verschiedenen Wasserversorgungsanlagen auf Keimzahl und Anwesenheit von Colibazillen untersucht.

2. In 68 Anlagen = 38 Proz. wurden Colibazillen gefunden, 118 Anlagen waren colifrei.

3. Unter den 747 untersuchten Proben erwies sichen 208 = 28 Proz. als colibazillenhaltig, demnach wurden in etwa ¾ der Proben Colibazillen nicht gefunden.

4. Der durchschnittliche Keimgehalt der colinegativen Anlagen bzw. Proben betrug 200 bzw. 182 Keime, der der colipositiven 581 bzw. 471, demnach haben Wässer mit Colibazillen also im allgemeinen auch eine höhere Keimzahl.

5. Von 208 colipositiven Proben wiesen 126, also 61 Proz., eine Keimzahl auf, welche unter 100 lag. Von diesen 126 Proben enthielten 77 = 61 Proz. eine Keimzahl zwischen 0 bis 30, 49 = 39 Proz. eine Keimzahl zwischen 31—99.

6. Daraus folgt der verhältnismäßig häufige Colibefund bei niedriger, nicht zu beanstandender Keimzahl.

7. Bei den Anlagen, in deren Proben Colikeime nachgewiesen wurden, haben sich in den meisten Fällen örtliche Verhältnisse feststellen lassen, welche das Hineingelangen von Colibazillen in das Wasser durchaus möglich erscheinen lassen.

8. In zahlreichen Fällen sind allein auf Grund des Nachweises von Colibazillen (bei gleichzeitig niedriger Keimzahl) durch die daraufhin erfolgte eingehende Untersuchung Mängel der Brunnenanlage festgestellt, die eine Verunreinigung des Brunnens hinreichend begründeten. Die Coliprobe stellte also unter Umständen einen empfindlicheren Test dar als die Keimzählung.

9. Da demnach die Keimzahlen durchaus nicht immer (abgesehen von Fehlerquellen) einen sicheren Maßstab für die bakteriologische Beschaffenheit eines Wassers abgeben, so ist die Untersuchung auf Colibazillen als eine wertvolle Bereicherung der bakteriologischen Trinkwasseruntersuchungsmethoden anzusehen.

10. Es sollte daher sowohl aus den unter 9 als auch unter 7 angeführten Gründen bei der bakteriologischen Beurteilung einer Wasserversorgungsanlage stets auf Colibazillen untersucht werden.

Rullmann (Darmstadt).

Henningson, B., Eine neue Methode zur Beurteilung der fäkalen Verunreinigung eines Wassers, gegründet auf die Veränderlichkeit des Gasbildungsvermögens von B. coli. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 74. 1913. p. 253—304.)

Die in sechs Abteilungen gegliederte Arbeit beginnt mit der „Colititer“-Bestimmungsmethode, die seit mehreren Jahren bei bakteriologisch-hygienischen Untersuchungen eingeführt, vielfach auch als großer Fortschritt be-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

zeichnet wird; Verf. aber führt hier mehrere dagegen sprechende Einwände an und hebt hervor, daß, wie auch schon bekannt, B. coli sehr in seinen Eigenschaften variiert.

In Abteilung II wird der „Coli-Begriff" erörtert. Nach Henningsons Untersuchungen ergibt sich, daß der wirkliche Darmcoli Stäbchenform besitzt, gramnegativ ist, Gelatine nicht verflüssigt, Gas aus Traubenzucker bildet und Milch koaguliert. Es finden sich jedoch vereinzelte Ausnahmen, besonders in betreff der letztgenannten Eigenschaft. Diese Eigenschaften können experimentell geändert werden und erleidet B. coli offenbar außerhalb des Darmes z. B. in Naturwasser oft eine Veränderung. Um exakter, als bisher möglich gewesen, die Gasbildung des B. coli beobachten zu können, bediente sich Verf. eines (p. 260) genau beschriebenen Gärapparates, welcher die Abbildung und auf den folgenden Seiten die Ergebnisse der Gärproben beigefügt sind. In der III. Abteilung wird die Vergärung von Traubenzucker durch B. coli im allgemeinen und das Verhältnis zwischen Gas und Säurebildung im besonderen besprochen.

Dann folgen in Abteilung IV die Gasbildung von B. coli und unter a) das Gasbildungsvermögen reingezüchteter Fäkalcolistämme, b) die Intensität und der Verlauf der Gasbildung bei Faecesaufschwemmungen, c) experimentelle Versuche, das Gasbildungsvermögen von B. coli dadurch zu beeinflussen, daß es in verschieden beschaffenem Wasser und unter verschiedenen Verhältnissen (Temperatur, Sonnenlicht usw.) gehalten wird. Hier sei hervorgehoben, daß das Gasbildungsvermögen des B. coli allmählich abnimmt, wenn das Bacterium in Wasser gehalten wird; enthält solches Nährstoffe für dasselbe und ist es der direkten Einwirkung des Sonnenlichtes entzogen, so behält es jedoch das Gasbildungsvermögen sogar jahrelang fort. Sobald aber eines oder zwei von diesen Momenten wegfallen, geschieht die Abnahme rascher.

In d) folgt die Prüfung des Gasbildungsvermögens bei Naturwässern verschiedenen Reinheitsgrades und in e) die Technik und Anwendung der neuen Methode. Tritt die Gasbildung schon nach 5—6 Stunden ein, so ist in dem Wasser eine sehr große Menge Fäkalcoli (bis 100 000 und mehr in 1 ccm) anwesend, also das Wasser fäkal sehr verunreinigt. Je mehr Stunden aber vor der Gasbildung vergehen, ist eine um so geringere Menge Fäkalcoli vorhanden und beginnt die Gasbildung erst nach 14—15 Stunden, so sind nur einzelne derartige Keime da, die Verunreinigung also gering. Tritt die Gasbildung noch später ein, dann hat überhaupt keine fäkale Verunreinigung stattgefunden. Ist solches aber nachweisbar doch der Fall gewesen, dann liegt solches weit zurück und es handelt sich nicht mehr um wirkliches Darmcoli, sondern um veränderte und abgeschwächte Keime. Die Gasmenge nach 24 Stunden darf, wenn wirklich fäkal verursacht, nicht weniger als etwa 5 ccm betragen; eine geringere Menge ergibt, daß eine wirkliche und frische derartige Verunreinigung nicht vorliegt. Nach 48 Stunden muß sie bei wirklicher Fäkalverunreinigung nicht weniger als 9 ccm betragen, im allgemeinen jedoch größer sein. In f) wird die Beschaffenheit des von B. coli gebildeten Gases besprochen.

Die Abteilung V bringt die quantitative Säurebildung aus Traubenzucker bei B. coli und den Schluß bildet Abteilung VI, das Vermögen, des B. coli, Milch zu koagulieren.

Nachstehend sind die sich ergebenden Schlüsse zusammengestellt:

I. Die Verwirrung bezüglich des B. coli-Begriffes beruht zum großen

Teil darauf, daß in Faeces in zahlreicher Menge degenerierte Colistämme vorkommen, die infolge ihrer Degeneration vor allem ein herabgesetztes Gärungsvermögen betreffs der Zuckerarten haben, in unserem Falle hier sowohl was die Gas- und Säurebildung aus Traubenzucker als auch was die Milchkoagulierung anbelangt. Im allgemeinen besitzen die Stämme volles Regenerationsvermögen bezüglich dieser Eigenschaften. In seltenen Fällen ist und bleibt jedoch trotz monatelanger Kultur und Umstechens auf Agar z. B. das Vermögen der Gasbildung aus Traubenzucker verloren. Unter degenerativ wirkenden Verhältnissen ist also eine anaërogene Varietät von B. coli entstanden. Wird diese letztere Eigenschaft als obligat für B. coli betrachtet, so muß man sagen, daß eine neue Art entstanden ist.

II. Durch die Einwirkung von Sonnenlicht und schlechten Ernährungsverhältnissen, d. h. der bakterienschädigenden Faktoren, die im allgemeinen draußen in der Natur (Wasser, Erdoberfläche usw.) vorliegen, erfährt das B. coli gleichwie in den Faeces während des Durchgangs durch den Dickdarm degenerative Veränderungen, die in einer Verlangsamung und Herabsetzung sowohl des Gasbildungs- als der anderen Arten von Gärungsvermögen zum Ausdruck kommen. Auch unter diesen Verhältnissen kann bisweilen die Entstehung eines konstanten, nicht gasbildenden Stammes nachgewiesen werden.

III. Diese Veränderung des Vermögens, Gas aus Traubenzucker zu bilden, gewährt die Möglichkeit, auf eine im Vorhergehenden beschriebene Weise und unter Anwendung eines besonders konstruierten Gasmessungsapparates einfacher und sicherer Wasser auf das Vorkommen fäkaler Verunreinigung hin zu prüfen, als es mittels der bisherigen Colititerbestimmungsmethode der Fall ist.

Der Verf. glaubt der obenerwähnten generellen Behauptung, daß das Gasbildungsvermögen des B. coli unter ungünstigen Verhältnissen langsam abnimmt, als weiteres Ergebnis hinzufügen zu können, daß diese Verhältnisse die Entstehung auch eines konstanten, nicht gasbildenden Bacteriums ermöglichen, wobei es sich also um eine wirkliche Variation, die zwar unter degenerativ wirkenden Verhältnissen stattgefunden hat, die aber doch eben wegen ihrer Konstanz nicht als bloß temporäre, auf zufälliger Degeneration beruhende Variation bezeichnet werden kann. — Weitere Folgerungen sind im Original nachzusehen. Rullmann (Darmstadt).

Das neue **Steroverfahren** zur Veredelung von Milch und Milcherzeugnissen. (Die Milch-Industrie. Jg. 1913. p. 16.)

Dieses Sterilisierverfahren ist so eingerichtet, daß vor allem eine nachträgliche Infektion der erhitzten Milch beim nachfolgenden Kühlen nicht stattfinden kann; die veränderten Eiweißsubstanzen sollen bei dem „Steroverfahren“ ihre Quellfähigkeit bzw. Löslichkeit wiedererhalten. Nahrungsmitteluntersuchungsämter bestätigten, daß die „Steromilch“ gegenüber roher, pasteurisierter und sterilisierter Milch bedeutende Vorzüge hätte.

Die in der Milch enthaltenen „Schwer- und Faulgase“, die hauptsächlich durch Futterstoffe wie Rüben, Schnitzel, Treber usw. hervorgerufen würden und sich beim Genuß sowohl wie bei der Verarbeitung der Milch speziell zu Butter unangenehm bemerkbar machten, werden beseitigt, infolgedessen kämen auch die Fäulnisbakterien ungleich weniger zur Vermehrung; weitere zusammengetragene Gründe versprechen weitere Vorteile.

Eine Abbildung der Apparatur zeigt, daß die Milch mit gespannter atmosphärischer Luft vermischt und mit Brunnenwasser oder Sole gekühlt wird. Die Luft wird zweimal gewaschen.

Das „Steroverfahren" wird von der Zentral Sterogesellschaft Berlin-Charlottenburg ausgeführt. Wolf (Kiel).

Rullmann, W., Vorläufige Mitteilung über Römers Arbeit: „Zur Schardinger-Reaktion der Kuhmilch." (Biochem. Ztschr. Bd. 48. 1913. p. 155.)

Polemik. W. Grimmer (Dresden).

Frick, Joseph, Untersuchungen über den Einfluß der Leukocytenzahl und der Entzündungsprodukte auf die Reaktion der Milch. [Dissertation.] Stuttgart 1912.

Verf. wurde zu seinen Untersuchungen in erster Linie durch die Arbeit von Höyberg veranlaßt, der gefunden hatte, daß die Milch euterkranker Kühe fast ausnahmslos alkalisch (gegen Rosolsäure) reagiert, mitunter schon lange, bevor eine klinische Diagnose gestellt werden konnte. Zur Untersuchung gelangte Kolostrum, Milch altmelker trächtiger und nichtträchtiger Kühe und schließlich Mastitismilch. Als Resultat ergab sich, daß die Höybergsche Methode als unbrauchbar zu bezeichnen ist, da in fast einem Drittel der untersuchten pathologischen Fälle erhöhte Azidität festgestellt wurde. Weiterhin entsprachen in positiven Fällen die erzielten Farbunterschiede durchaus nicht denen, die in Höybergs Skala angegeben sind. Im übrigen wurde folgendes gefunden: 1. Kolostrum besitzt bei hohem Leukocytengehalte erhöhte Azidität. 2. Altmelke Milch trächtiger Kühe zeichnet sich durch verminderte Azidität und erhöhten Leukocytengehalt aus, während die altmelke Milch nichtträchtiger Tiere lange Zeit normale Beschaffenheit besitzt. 3. Bei Mastitismilch war in den meisten Fällen verminderte Azidität zu beobachten, bei akuten Erkrankungen findet man jedoch zunächst eine Erhöhung der Azidität, die erst im Verlaufe der Krankheit abnimmt und unter die Norm sinkt. 4. In der Mehrzahl der Fälle wurde ein Parallelismus zwischen Leukocytenmenge und der Anzahl der Bakterien festgestellt, gleichzeitig wurde beobachtet, daß in der Regel mit zunehmender Leukocytenzahl die Azidität absinkt. Am geeignetsten hat sich zur Untersuchung die Trommsdorffsche Leukocytenprobe erwiesen.

W. Grimmer (Dresden).

Scheel, Hartwig, Eignet sich die Schardinger-Reaktion zur Feststellung des Frischmilchendseins der Kühe? [Diss.] Hannover 1912.

Verf. untersuchte die Brauchbarkeit der Schardingerschen (F. M.) Reaktion zum Nachweise des Frischmilchendseins der Kühe, nachdem Schern sie für diesen Zweck empfohlen hatte. Dieser hatte bekanntlich gefunden, daß kurz nach der Geburt die Schardinger-Reaktion in der Milch mehr oder weniger lange ausbleibt. Verf. fand nun folgendes:

1. Die Anfangsmilch frischmilchender Kühe entfärbt im allgemeinen das Schardinger-Reagens nicht oder nicht innerhalb 30 Minuten. Die Schardinger-Reaktion bleibt durchschnittlich 3 oder 4 Wochen aus, eine Gesetzmäßigkeit in ihrem Ausbleiben existiert aber nicht. Die Entfärbung der Methylenblau-Formalinlösung durch die Anfangsmilch frischmilchender Kühe tritt bei 45° schneller als bei 65° ein.

2. Die Milch altmilchender Kühe entfärbt in den meisten Fällen das Schardinger-Reagens und zwar: Anfangsmilch innerhalb 30 Minuten, Restmilch innerhalb 12 Minuten. Abweichungen von dieser Regel kommen sehr häufig vor. Die optimale Temperatur liegt für Anfangsmilch bei 45°, für Restmilch bei 65°. Morgenmilch liefert die Reaktion früher als Abendmilch. Die Milch einzelner Euterviertel einer und derselben Kuh können ein verschiedenes Verhalten gegenüber der Methylenblau-Formalinlösung zeigen.

3. Die Milch euterkranker Kühe verhält sich dem Schardinger-Reagens gegenüber verschieden: bei normaler Farbe und Beschaffenheit des Sekretes ist die Reaktionszeit normal, bei starker Veränderung derselben tritt eine Verzögerung in der Reaktion ein.

Aus diesem Verhalten ergibt sich, daß für die Diagnose des Frischmilchendseins der Kühe das Schardinger-Reagens nicht entscheidend sein kann. W. Grimmer (Dresden).

Metzger, Karl, Untersuchungen über die Alkoholprobe bei Milch von kranken Kühen. [Diss.] Stuttgart 1912.

Die Untersuchungen von Metzger führten zu folgenden Resultaten: Zwischen dem Säuregrad und dem Ausfall der Alkoholprobe der Milch kranker Tiere besteht keine regelmäßige Beziehung. Fieber war weder auf den Säuregrad noch auf den Ausfall der Alkoholprobe der Milch von Einfluß. Eine Beziehung zwischen Alkoholprobe und Tuberkulose besteht nicht. Erst wenn infolge tuberkulöser Schwindsucht ein erheblicher Rückgang im Nährzustande eingetreten ist, neigt die Milch zur Gerinnung mit Alkohol. Ebenso ist ansteckender Scheidenkatarrh ohne Einfluß auf die Alkoholprobe. Beziehungen zwischen Alkoholprobe der Milch und Indigestion verschiedener Art besteht nicht.

Die Milch von Kühen, die verkalbt haben, gerinnt regelmäßig längere Zeit mit Alkohol. Erkrankungen der Gebärmutter zeigen sich durch die Alkoholprobe fast regelmäßig, aber nicht ausnahmslos an. Schwere Erkrankungen an Tuberkulose und der Gebärmutter können durch die Alkoholprobe nicht angezeigt werden, selbst in solchen Fällen nicht, in denen die Milch sanitätspolizeilich zu beanstanden ist.

Der Hauptwert der Alkoholprobe besteht in der Ermittlung der Frische der Milch. W. Grimmer (Dresden).

Pallmann, Karl, Die Milch-Labhemmprobe. [Diss.] Stuttgart 1912.

Verf. untersuchte eine große Zahl von normalen Milchproben, Kolostrum, altmelke Milch und Mastitismilch auf ihre Labfähigkeit nach Schern. Als Normallab diente ihm ein flüssiges Präparat von der Wirksamkeit von ca. 1 : 6000. Er fand, daß normale Milch, Einzelgemelke und Sammelmilch, im allgemeinen erst bei einer Verdünnung von 1 : 1000—1 : 1500 Hemmung der Labwirkung zeigen. Die meisten Proben geronnen aber noch bei größeren Verdünnungen, die Schwankungen bewegten sich innerhalb sehr weiter Grenzen (1 : 1000—1 : 4000). Bei Kolostrum ist die Labfähigkeit nur 3—4 Tage post partum deutlich herabgesetzt und nimmt dann die Gerinnungsfähigkeit normaler Milch mit den üblichen Schwankungen an. Sonach ist die Labhemmprobe zum Nachweise des Frischmilchendseins nicht zu verwenden. Altmelke Milch zeigt zuweilen, aber nicht immer, deutlich herabgesetzte Labfähigkeit. Bei hochgradiger Stauungsmastitis und in noch höherem Maße bei infektiöser Mastitis zeigt das Sekret stark verminderte oder selbst aufgehobene Labfähigkeit. Die Labhemmprobe ist somit brauchbar zur Ermittelung pathologischer Eutersekrete und ihre Verwendung ist besonders in Verbindung mit der Milchleukocytenprobe zu empfehlen. Der allgemeinen Anwendung steht die Schwierigkeit der Gewinnung einer Labstandardlösung im Wege.

W. Grimmer (Dresden).

Sommerfeldt, Sigurd, Beitrag zur Bestimmung des Keimgehaltes in der Milch. [Diss.] Leipzig 1912.

Verf. stellte vergleichende Keimzählungen in Milch mit verschiedenen Nährböden und bei verschiedener Temperatur, sowie verschiedenen Milchverdünnungen an. Er fand, daß bei Zimmertemperatur durchschnittlich ⅓ mehr Keime wachsen als bei Bruttemperatur, ebenso nimmt die Keimzahl mit zunehmender Verdünnung der Milch zu. Für keimreiche Marktmilch ist eine Verdünnung von 1 : 50 000 zu empfehlen. Von den verschiedenen Nährböden ist Milchserumagar als der beste anzusehen. Bei Bruttemperatur waren die Milchkeime meist zwischen dem 3. und 5. Tage, bei Zimmertemperatur zwischen dem 4. und 7. Tage ausgewachsen. Für die praktische Durchführung der Keimbestimmung ist folgendes zu beachten:

Die Milchverdünnung ist so zu bemessen, daß beim Plattenverfahren etwa 100—500 Keime aufgehen. Bei Milch von völlig unbekanntem Keimgehalt wählt man Verdünnungen von 1 : 50, 1 : 500, 1 : 5000, 1 : 50 000. Die Kultivierung ist bei Zimmertemperatur durchzuführen, die Dauer derselben auf 5—7 Tage auszudehnen.

Der beobachtete Keimgehalt der Dresdener Marktmilch schwankte zwischen 1,6 und 186 Millionen in 1 ccm und betrug im Mittel 43 200 000.

W. Grimmer (Dresden).

Ulmann, Hermann, Untersuchungen von Milch euterkranker Kühe auf ihren Enzymgehalt. [Diss.] Stuttgart 1912.

Verf. untersuchte insgesamt 55 Milchproben von 13 euterkranken Kühen auf ihren Enzymgehalt. Von diesen Tieren litten acht an akuter parenchymatöser, zwei an chronischer parenchymatöser, eine an akuter katarrhalischer Mastitis und zwei an Eutertuberkulose. Er fand, daß der Enzymgehalt in der Milch euterkranker Tiere im allgemeinen erhöht ist, dabei aber großen Schwankungen unterworfen ist. Er ist weniger von den klinischen Erscheinungen am Euter, als vielmehr vom Grade der Veränderung des Sekretes abhängig. Der Katalasegehalt ist in Mastitismilch fast regelmäßig wesentlich erhöht und zwar während der ganzen Dauer der Mastitis und häufig auch noch längere Zeit nach der klinisch festgestellten Abheilung. Katalasereiche Mastitismilch reagiert in frischem Zustande mehr oder weniger stark alkalisch. Reduktase ist zu Beginn einer Mastitis meistens in normalem oder erhöhtem Maße vorhanden, hochgradig veränderte Milch zeigt einen verminderten Gehalt bis zu einem vollständigen Fehlen des Schardinger-Enzyms. Zur Feststellung einer Mastitis erscheint dieses Enzym somit nicht geeignet. Der Gehalt an Peroxydase ist in der Mastitismilch oftmals erhöht, mitunter aber auch normal oder erniedrigt, in hochgradig veränderten Sekreten fehlt sie mitunter vollständig. Der Diastasegehalt ist ein außerordentlich variabler und läßt somit keine Schlüsse auf die Beschaffenheit einer Milch zu. Von sämtlichen Enzymreaktionen liefert nur die Katalaseprobe sicheren Aufschluß über das Vorhandensein einer bestehenden Mastitis. Als geeigneter Apparat ist der Henkelsche Katalaseapparat zu empfehlen. Grimmer (Dresden).

Vollrath, Carl, Untersuchungen über den Einfluß äußerer und innerer Krankheiten auf den Enzymgehalt der Kuhmilch. [Diss.] Stuttgart 1912.

Verf. untersuchte die Milch von 54 teils an äußeren, teils an inneren Krankheiten leidenden Kühen auf ihren Gehalt an Peroxydase, Katalase, Diastase und Reduktase. Er fand, daß der Gehalt der Milch an Peroxydase weder durch äußere, noch durch innere Krankheiten beeinflußt wird. Bezüglich des Diastasegehaltes treten nur ganz geringe nicht regelmäßige Abweichungen von der Norm auf. Die Erkrankung an Maul- und Klauenseuche führt in der Regel eine Erhöhung des Reduktase- und Katalasegehaltes herbei; diese Erhöhung bleibt mindestens auch noch eine Zeitlang nach der Abheilung bestehen. Auch in einigen anderen Fällen: Bläschenausschlag, Retentio secundinarum, Indigestion, traumatische Pericarditis, wurde eine Erhöhung des Reduktase- bzw. Katalasegehaltes angetroffen, aber nur ausnahmsweise. Bei anderen Fällen derselben Krankheiten blieb die Erhöhung aus. Nach der Ansicht Vollraths eignen sich die Enzymmethoden nicht zur Feststellung, ob eine Milch von äußerlich oder innerlich kranken Tieren (Euterentzündungen und Maul- und Klauenseuche ausgenommen) stammt. Eine Parallelität zwischen Reduktase- und Katalasegehalt bestand nicht. W. Grimmer (Dresden).

Devarda und Weich, Die Morressche „Alizarolprobe" zur Prüfung der Haltbarkeit der Milch. (Molkerei-Ztg., Berlin. Jahrg. 23. 1913. p. 338.)

Verff. kommen bezüglich der Brauchbarkeit des Morresschen Verfahrens für die Marktkontrolle unter anderem zu dem Ergebnis, daß bei einer stark vorgeschrittenen Säuerung der Milch, ferner wenn neben der Milchsäuregärung anderweitige mehr oder weniger alkalisch reagierende Zersetzungsprodukte entstehen, man aus dem Farbenton der Alizarinprobe den Säuregrad der Milch nicht immer mit genügender Schärfe feststellen kann. In strittigen Fällen ist daher die titrimetrische Bestimmung des Säuregrades der Milch dem Alizarinverfahren vorzuziehen. Eine durch die Alizarolprobe hervorgerufene Gerinnung, die dem Säuregrad bzw. dem Farbenton der Alizarinprobe nicht entspricht, deutet auf eine anormale Zusammensetzung in der Milch hin, die durch die Einwirkung hauptsächlich labbildender und peptonisierender Bakterien bedingt werden; durch die Alizarolprobe läßt sich jedoch nicht immer mit Sicherheit feststellen, ob eine reine Labgärung oder eine sog. gemischte Gärung vorliegt. Diese Erscheinung kann aber auch hervorgerufen werden, wenn frische Milch mit saurer Milch vermischt wird, ferner wenn in einer bereits sauer gewordenen Milch deren Azidität teilweise durch Alkali neutralisiert wird. Der Schlußsatz lautet: „Der Hauptvorteil der Alizarolprobe besteht darin, daß die Farbenreaktion rasch und gleichzeitig mit der Alkoholprobe auch von den Marktorganen mit genügender Sicherheit ausgeführt werden kann. Dieses Verfahren ist daher bei der Marktprobe der reinen Alkoholprobe vorzuziehen."

Wolff (Kiel).

König, J., Hasenbäumer, J. u. Glenk, K., Über die Anwendung der Dialyse und die Bestimmung der Oxydationskraft für die Beurteilung des Bodens. (Die landw. Versuchs-Stat. Bd. 79/80. 1913. p. 491—534.)

Es ergab sich, daß bei allen Böden (mit Ausnahme eines Tonbodens) die Menge der dialysierbaren Pflanzennährstoffe durch Erhitzen auf 150 bis 180°, aber auch schon durch Trocknen im Vakuum bei 95—98° und 50 bis 100 mm Druck eine, wenn auch nur geringe, so doch deutlich nachweisbare Vermehrung erfährt, ein Ergebnis, das zweifellos darin seinen Grund hat, daß durch das Trocknen die kolloidale Beschaffenheit des Bodens zum Teil aufgehoben wird und dadurch adsorbierte Nährstoffe löslich werden. Aus anderen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß schon das gewöhnliche Austrocknen des Bodens unter natürlichen Verhältnissen eine teilweise Aufhebung des kolloidalen Zustandes und damit eine Erhöhung der Löslichkeit der kolloidal gebundenen Nährstoffe zur Folge hat.

Von größerer Bedeutung für die Beurteilung der Fruchtbarkeit eines Bodens ist seine Oxydationskraft, d. h. die Intensität der Kohlensäure- und Salpeterbildung. Verff. haben sich daher bemüht, diese bakteriellen Funktionen zu bestimmen und in Beziehung zur Ertragsfähigkeit zu bringen. Bei den Versuchen wurde durch je 1 kg des zu untersuchenden Bodens Luft geleitet und die mitgeführte Kohlensäure aufgefangen und gewogen. Zur Verwendung kamen Böden der verschiedensten Art, teils unter Zusatz von Glukose und Harnstoff. Nach jedem Versuch wurden bestimmt: die Anzahl der Bakterienkeime, die katalytische Kraft (Sauerstoffentbindung aus Wasserstoffsuperoxyd für 5 g Boden in 2 Stunden), die elektrolytische Leitfähigkeit nach 8stündigem Stehen in Leitfähigkeitswasser, ferner der Gehalt an Ammoniak und Salpetersäure in den Harnstoffreihen.

Die Kohlensäurebildung aus Glukose erfolgte bei den einzelnen Böden in einem bestimmten Verhältnis, das sich durch folgende Zahlen ausdrücken läßt, wobei die Menge der durch Sandboden gebildeten Kohlensäure = 100 gesetzt ist:

Sandboden	100
Lehmiger Sandboden	131
Lehmboden	161
Kalkboden	499
Tonboden	278
Schieferboden	273.

Auch bei der Umwandlung des Harnstoffes traten charakteristische und bemerkenswerte Unterschiede auf. Am energischsten oxydierten Lehm- und Kalkboden, die geringste nitrifizierende Energie wies Ton- und Sandboden auf.

Die Keimzahl war in den mit Glukose versetzten Böden erheblich angestiegen, auch die katalytische Kraft dieser Böden war erhöht. Die mit Harnstoff versetzten Böden wiesen für Bakterienzahl und katalytische Kraft keine eindeutigen Beziehungen auf. Ein übereinstimmendes Verhalten zeigte aber die elektrolytische Leitfähigkeit, die stets in den stark nitrifizierenden Böden am höchsten war.

Im ganzen lehren die Versuche, „daß die Bestimmung der Oxydationskraft sehr geeignet ist, unseren Einblick in die Eigenschaften der einzelnen Bodenarten zu erweitern. Als Zusatz von zu oxydierenden Stoffen haben sich Glukose und Harnstoff, je 1 g auf je 1 kg Boden, recht gut bewährt.“

Die erhaltenen Resultate gaben Veranlassung zu ermitteln, wie sich das Pflanzenwachstum in einem vorher erhitzten und in einem mit Glukose vermischten Boden gegenüber natürlichem Boden gestaltet. Auf die Einzelheiten der Versuche soll hier nicht eingegangen werden. Das Resultat war, daß das Erhitzen der Böden sowohl eine Erhöhung der geernteten Trockensubstanz als auch der aufgenommenen Mineralstoffe zur Folge hatte, wie es nach dem Verhalten der Böden bei der Dialyse und elektrolytischen Leitfähigkeit erwartet werden konnte. Ein regelmäßiges, wechselweises Austrocknen und Wiederanfeuchten des Bodens muß daher die Bildung löslicher Nährstoffe und damit das Pflanzenwachstum fördern, wie es auch die allgemeine Erfahrung lehrt.

Zuckerzusatz führte zu Erntedepressionen, die auf den verschiedenen Böden verschieden groß waren. Hierzu bemerken die Verff.: Ist der Boden ein sehr tätiger, oder sind die zugeführten Zuckermengen nur verhältnismäßig gering, so daß der Zucker ganz zersetzt wird, so wird die erhöhte Kohlensäurebildung bzw. erhöhte Lösung von Nährstoffen, bzw. die Förderung des organischen Lebens im Boden eine Ertragssteigerung der Kulturpflanzen zur Folge haben. Bleibt aber ein Teil des Zuckers unzersetzt im Boden, so wird er als Nichtelektrolyt die Wanderung der Ionen im Boden bzw. als Schutzkolloid die Ausflockung der Kolloide hemmen und damit das Wachstum der Kulturpflanzen schädigen. (Die schädliche Zuckerwirkung beruht aber auch, was die Verff. ganz unberücksichtigt lassen, auf der sofortigen Festlegung jeder Spur löslichen Bodenstickstoffs und der unter Umständen lang andauernden Hemmung der Nitrifikation. Ref.)

„Es erscheint nach diesen Beobachtungen und Ermittelungen die Annahme wahrscheinlich, daß die Aufnahme der Nährstoffe aus dem Boden durch die Pflanzen auf Ionen-Austausch beruht.“ Vogel (Bromberg).

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien etc.

Oker-Blom, M., Über die Wirkungsart des ultravioletten Lichtes auf Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 74. 1913. p. 242—247.)

Aus den die Einleitung bildenden Literaturangaben sei hervorgehoben, daß nach Ansicht mehrerer Forscher die ultravioletten Strahlen im bestrahlten Körper Ozon erzeugen und nach Behring steigern dieselben die reduzierenden und die oxydierenden Prozesse im Gewebe des lebenden Tieres. Axmann findet eine allgemeine Steigerung des Stoffwechsels unter dem Einflusse dieser Strahlen und Quincke sieht die Wirkung auf die lebende Zelle ebenfalls als eine Beförderung des Oxydationsprozesses an. Hertel spricht von einer direkten Beeinflussung des Protoplasmas; je kürzer die Wellenlänge der Strahlen, desto rascher werden Bakterien, Infusorien usw. geschädigt und getötet. Noch weitere niedergelegte Anschauungen auf diesem Gebiete zeigen, daß die Wirkungsart des ultravioletten Lichtes auf die Zelle noch nicht endgültig geklärt ist.

Der Verf. vorliegender Arbeit hat sich in seinen Versuchen die Frage gestellt, ob die keimvernichtende Wirkung der Strahlen in einer eventuellen Erzeugung von Ozon oder Wasserstoffsuperoxyd bzw. einer sekundären Oxydation des lebenden Protoplasmas der Zellen begründet oder ob eine solche Art der Strahlenwirkung ausgeschlossen sei.

Unter Verweisung auf die Einzelheiten der sehr interessanten Versuche darf aus denselben der Schluß gezogen werden, daß die keimvernichtende Wirkung der ultravioletten Strahlen nicht in einer Salpetersäure- bzw. Ozon- oder Wasserstoffsuperoxydwirkung begründet ist, sondern als eine direkte Wirkung der kurzwelligen Strahlen auf die Bakterien bzw. auf das lebende Protoplasma aufzufassen ist. Hiermit ist aber keineswegs gesagt, daß nicht diese Wirkung eventuell von nebenher unter dem Einflusse des ultravioletten Lichtes sich vollziehenden chemischen Prozessen sekundär befördert oder auch nachteilig beeinflußt werden könnte. Rullmann (Darmstadt).

Wehmer, C., Selbstvergiftung in Penicilliumkulturen als Folge der Stickstoffernährung. (Ber. d. deutschen bot. Gesellsch. 1913. p. 210—225.)

In Kulturen einer vorläufig als Penicillium variabile bezeichneten Penicillium-Art fing der Pilz bei Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak nach einer Woche an abzusterben. Wurde Stickstoff in irgend einer anderen Form geboten, so wuchs der Pilz normal. Die Ursache des Absterbens liegt im Auftreten freier Schwefelsäure (etwa 0,2 Proz.) durch die Verarbeitung des $(NH_4)_2\ SO_4$. Bei gleichzeitiger Anwesenheit einer abstumpfenden Verbindung (Kreide) gedeiht der Pilz. Interessant ist, daß der Pilz durch sein eigenes Stoffwechselprodukt schließlich völlig zugrunde ging, nicht nur im Wachstum gehemmt wurde.

Verf. knüpft daran noch einige allgemeine Bemerkungen über die Ernährungsbedingungen der Pilze, vorzüglich über die Wirkung freier Säure und der Stickstoffquelle. Rippel (Augustenberg).

Codur, J. et **Thiry, G.,** Aspergillus et argent métallique. (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 74. 1913. p. 487.)

Des pièces d'argent plaçées dans du liquide Raulin n'ont pas empêché la culture d'Aspergillus fumigatus, A. flavus, Sterigmatocystis nigra. Kufferath (Bruxelles).

Javillier, Influence du zinc sur la consommation par l'Aspergillus niger des aliments hydrocarbonés, azotés et minéraux. (Compt. Rend. Acad. Scienc. Paris. T. CLV. 1912. p. 190—193.)

Die Vermehrung des Trockengewichtes bei der Ernte ist auf die Gegenwart von Zinkspuren zurückzuführen, da dann die dargebotene Nahrung besser verwendet wird. Wird als Stickstoffquelle weinsteinsaures Ammonium verwendet, so wird der notwendige Zucker beim Wachstume der Sterigmatocystis nigra in einer 2—3-mal so großen Menge zersetzt bei Gegenwart von Zink. Ein solcher Pilz enthält in seiner Asche mehr P und Si, aber weniger S als wenn er ohne Zink aufgezogen wurde. Bei Gegenwart von Zink häufen sich unter den katalytisch wirkenden Elementen Mangan in größerer Menge an als Magnesium. Matouschek (Wien).

Kiesel, Sur l'action de divers sels acides sur le développement de l'Aspergillus niger. (Compt. Rend. Acad. Scienc. Paris. T. CLV. 1912. p. 193—196.)

Die Hemmung der Keimung, der Mycelentwicklung und der von Sporen

ist für 27 Säuren bzw. deren Salze durch Angabe der noch zulässigen Dose bestimmt worden. Dabei zeigte es sich im allgemeinen, daß letztere bezüglich der genannten 3 Phänomene für jede Substanz die gleiche ist. Hierbei entspricht die physiologische Wirkung der Säuren und deren Salze der chemischen Wirkung dieser. Die giftige Wirkung der Substanzen hängt außer von der chemischen Funktion der Stoffe auch ab vom Grade der Auflösung dieser und von dem Grade der Durchlässigkeit der Plasmaschichte.

Matouschek (Wien).

Clement, H., Action de l'argent sur la végétation de l'Aspergillus niger. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 74. 1913. p. 749.)

L'auteur indique qu'il a pu obtenir le développement de cultures d'Aspergillus niger sur des milieux à base de collargol, argyrol, de protargol, ainsi que dans des baquets d'argent remplis de liquide de Raulin. Il est à remarquer que la croissance ne se fait pas toujours régulièrement.

H. Kufferath (Bruxelles).

Böeseken, J., et **Waterman, H.,** Sur l'action de quelques dérivés du benzène sur le développement de Penicillium glaucum. (Arch. néerland. des scienc. exact. et natur. Sér. III. B. T. 1. 1912. p. 117—133.)

Penicillium glaucum est ensemencé dans des milieux minéraux liquides additionnés des corps à expérimenter. Les cultures sont maintenues à 28—29° et à l'obscurité. B. et W. constatent que les corps qu'ils ont essayés sont utilisés comme aliments, non pas à cause de leur dissociation mais à cause de la nature, du nombre et du groupement des éléments dans la molécule. B. et W. ont essayé les corps suivants: phénol, pyrocatéchine, résorcine, hydroquinone, pyrogallol, phloroglucine, acides oxybenzoïques, acides dioxybenzoïques, acide anisique, acide guayacolcarbonique, acides trioxybenzoïques, acide benzoïque, acides toluyliques, l'acide quinique. — Le groupement OH favorise la croissance (phénol), tous les composés polyoxygénés peuvent être plus ou moins assimilé. Le groupement CO.OH (carboxyle) est moins favorable que OH, ainsi par ex. sont assimilés acide benzoïque, acide 0-phtalique. — Les groupements méthylique, méthylènique, sulfoniques sont défavorables. La combinaison de plusieurs groupes OH ou COOH ou des deux favorise l'attaque de ces combinaisons par P. glaucum. — La situation ortho-diminue l'action favorable. L'ac. benzoïque et les ac. toluyliques ont une action retardatrice plus forte que l'acide salicylique, les acides m- et p-toluyliques ont une influence plus grande que 0-toluylique et ac. benzoïque. L'acide p-oxybenzoïque peut servir de source de C. L'acide salicylique exerce une action inhibitrice nette. L'acide gentisique n'exerce pas d'inhibition et ne peut servir d'aliment. — L'acide salicylique malgré son action inhibitrice peut servir d'aliment, il est transformé par P. glaucum en acide gentisique. — Si l'on fait des essais avec des quantités croissantes d'acides, on observe un maximum de développement pour certaines concentrations, ce maximum se trouve pour l'acide p-oxybenzoïque entre 89.7 et 119.7 mg (pour 50 cc. de solution), pour l'acide m-oxybenzoïque vers 93.3 mg, pour l'acide protocatéchique vers 600 mg, pour l'acide 0-phtalique entre 71.2 et 124 mg, pour le phénol entre 8.9 et 10.4 mg. A une concentration supérieure au maximum indiqué, les divers corps cités empèchent la croissance de P. glaucum B. et W. indiquent que la fixation du maximum de concentration des sels permettant la culture permet de connaître leur valeur comme source de C: plus le maximum est élevé et mieux la substance convient comme nourriture.

B. et W. établissent qu'il y a parallélisme évident entre le coefficient de partage des diverses combinaisons benzéniques entre l'huile d'olive et l'eau à 25° C et l'action inhibitrice exercée par les combinaisons sur P. glaucum.

Kufferath (Bruxelles).

Lasseur, Ph., Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses Bactéries. (Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. 74. 1913. p. 496—498.)

En milieu synthétique I de Lasseur privé de sulfate ferreux, on observe une végétation faible, le milieu liquide reste incolore avec: Bac. subtilis, B. mesentericus, B. m. vulgatus, B. vulgatus, B. peptonis XII, B. mesentericus ruber, B. mesentericus fuscus, B. megatherium. En présence de sulfate ferreux, ces Bactéries donnent des cultures diversément colorées, la végétation est forte. Le fer favorise donc la végétation et détermine la coloration des cultures. L. a obtenu des résultats analogues avec le citrate ferreux, le chlorure ferrique, le sulfate de fer ammoniacal, l'alun de fer ammoniacal. Le fer ne peut être remplacé dans son action par le manganèse, le nickel, le cobalt, le zinc, le chrome. La coloration produite par le fer semble due à la combinaison d'une substance incolore avec le fer, la combinaison étant colorée. Kufferath (Bruxelles).

Weinzirl, John and Thomas, J. Bosley, A Comparison between the Sand Filtration Method and the Bubbling Method for Enumerating Bacteria in the Air. (Amer. Journ. of Public Health. Vol. 3. 1913. p. 171.)

The authors worked independently, each devising his own apparatus and technic. The results were finally compared and showed considerable agreement. They used the apparatus devised by Rettger for the bubbling method and constructed sand filters for the sand filtration method. According to the results obtained the two methods compare favorably so far as accuracy is concerned. The question resolves itself largely into one of comparative convenience of the two methods. While it is somewhat easier to make plates from water tubes, the authors find the sand filters easier to operate in every other way. The aëroscope is more difficult to make or more expensive if purchased, is more easily broken and more often gets out of order. The accuracy of water filters is impaired through evaporation of the water. On the whole the aëroscope gives more trouble especially in field work. The results of counts from water are smaller than from sand. The authors think this may be due to absorption of sulphur dioxide by the water and some of the bacteria restrained thereby. P. G. Heinemann (Chicago).

Lauterborn, Robert, Die biologische Selbstreinigung unserer Gewässer. (Verhandl. d. naturhist. Ver. d. preuß. Rheinl. u. Westfal. Jahrg. 68. 1911. 2. Hälfte. 1912. p. 473—487.)

Verf. entwirft ein Bild, wie die Selbstreinigung in unseren Gewässern sich vollzieht. Die gelöste organische Substanz wird zunächst von dem Heer der Bakterien angegriffen. Abwasserpilze gedeihen nur dort, wo ein kontinuierlicher Strom gelöster organischer Substanz sie umspült. Die Algen nehmen erst dann Eiweißkörper und Kohlehydrate auf, wenn sie genug abgebaut sind. Die feste organische Substanz der Abwässer wird meist von den Tieren gefressen (Protozoen und Würmer besonders). Die Selbstreinigung

ist im wesentlichen beendigt, wenn von Muscheln auch die Unionen und Anodonten wieder zahlreicher auftreten, wenn Gammarus pulex, die Larven der Ephemeriden und gewisser Trichopteren in größeren Mengen die Steine des Ufers beleben. Als Durchlüfter spielen die grünen Pflanzen eine wichtige Rolle, doch auch als biologischer Filter: ihre vielen fein verteilten Blätter vergrößern sehr beträchtlich die reinigende Fläche, mit welcher die zuströmenden Abwässer in Berührung kommen müssen. Die letztere Rolle wurde bisher nur wenig gewürdigt, trotzdem sie mitunter geradezu ausschlaggebend ist. An einem lehrreichen Beispiele, dem Ill bei Straßburg, wird dies vom Verf. gezeigt: Im Winter gehen die Pflanzen zurück. Da doch die widerstandsfähigeren (Elodea, Ceratophyllum, Batrachium, Sparganium, Scirpus) am Grunde noch ausdauern, so bemerkt man unterhalb der Pflanzenbänke (unterhalb der Wanzenauer Brücke) doch eine Abnahme der Bakterienzahlen im freien Wasser. Ganz anders aber im August (1910): unterhalb der Brücke fiel die Zahl der Bakterien von 131 700 im ccm auf nur 4830 und bleibt auch weiterhin so niedrig bis zum Rhein. Hierbei muß man betonen, daß die abnehmende Zahl gleichzeitig auch die entsprechende Abnahme der festen Abwasserreste bedeutet, denn die Bakterien treiben abwärts an feinen Partikelchen. Die Selbstreinigungskraft eines Gewässers ist direkt proportional der Absorptionsfläche seiner Pflanzen- und Tierwelt. Die jetzt beliebte Art der Korrektionen unserer Flüsse schwächt auch deren natürliche Selbstreinigungskraft in ganz bedenklicher Weise. — Zuletzt begründet Verf. den Satz, daß stehende Gewässer die relativ größte Selbstreinigungskraft haben: In allen rascher fließenden Gewässern ist die Selbstreinigung zumeist eine Funktion der Bodenfauna und -Flora. Wegen des im stehenden Wasser vorkommenden Plankton wird hier aber der ganze Bereich des Wassers ausgenützt. Die erstaunliche Fähigkeit der Dorfteiche, selbst sehr große Mengen von Abwässern aufzuarbeiten, in Fischnahrung und zuletzt in Fischfleisch umzuwandeln, hat Hofer den Gedanken eingegeben, auch die städtischen Abwässer (nicht giftige) direkt in Fischteichen zu reinigen. Die neuerdings bei Straßburg erzielten Erfolge sind ermutigend. Hofers Methode bedeutet also einen gewaltigen Schritt nach vorwärts. Mögen bald mehr Anhänger dieser Methode entstehen. Matouschek (Wien).

Oker-Blom, M., Über die keimtötende Wirkung des ultravioletten Lichtes in klarem, getrübtem und gefärbtem Wasser. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 74. 1913. p. 197—242.)

Da die Leser des Centralbl. f. Bakt. durch Referate über ähnliche Arbeiten bereits des öfteren in letzter Zeit informiert wurden, so kann die Einleitung der vorliegenden Arbeit, welche bekannte, einführende Angaben enthält, weggelassen werden. Die eigenen Versuche des Verf. bringen Aufschluß, wie weit die Wassersterilisation mit ultravioletten Strahlen durchführbar ist und erforschen im besonderen, inwieweit in natürlichen Grenzen vorkommende Trübungen und Färbungen des Wassers den keimvernichtenden Wirkungen genannter Strahlen entgegenarbeiten. Zur Ausführung der Untersuchungen wurden besondere Skalen für den Grad der Trübung und die Intensität der Färbung hergestellt; die Testbakterien wurden aus 1—3-tägigen Agarkulturen gewonnen und die benutzten Standardaufschwemmungen zur Vermeidung von Bakterienklümpchen filtriert, wobei B. coli com., B. paratyphi B, Vibrio El-Tor und der sporenbildende B. peptonificans zur Anwendung kamen. Die Versuche selbst wurden mit dem Nogier-Triquet Type M_5-Apparat angestellt, über welchen gleichfalls hier schon früher berichtet ist.

Die ausgeführten hochinteressanten Versuche (p. 205—236) in 18 Serien seien eingehender Durchsicht empfohlen.

Verf. sagt von denselben, daß die Lösung der gestellten Aufgabe nur bedingt gelungen sei, da zu einer einwandfreien Beantwortung der gestellten Fragen ein Apparat zur Verfügung stehen mußte, der von mehreren, dem benutzten Apparat anhaftenden Mängeln und Fehlerquellen frei sein mußte und ein durchaus exaktes Arbeiten gestattet hätte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Verf. lassen sich etwa in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. In bezug auf die Leistungsfähigkeit des Trinkwassersterilisators, Type Nogier-Triquet M_5, welcher zu den Versuchen benutzt wurde, hat sich herausgestellt, daß, wenn das zu bestrahlende Wasser (Berner Leitungswasser) vollkommen klar und farblos ist, Sterilität bezüglich der angewandten Testkeime zu erzielen ist bei einer Durchflußgeschwindigkeit des Wassers von etwa 50—60 l pro Stunde und einem Bakteriengehalt von etwa 10 000 Keimen in einem ccm; es wurde nur dann von Sterilität gesprochen, wo die Testkeime selbst durch das Anreicherungsverfahren nicht nachgewiesen werden konnten. Bei dem gleichen Keimgehalt und einer Durchflußgeschwindigkeit von 180 l pro Stunde ist dagegen kein steriles Wasser zu erhalten, ebensowenig wie bei einem Keimgehalt von 99—160 000 Keimen in einem ccm und einer verminderten Durchflußgeschwindigkeit von nur 50 l pro Stunde. Die genaueren Grenzen für die keimtötende Wirkung des Apparates in bezug auf Durchflußgeschwindigkeit und Keimgehalt sind nicht ermittelt worden.

Ferner hat sich erwiesen, daß im Apparate von Nogier-Triquet das keimvernichtende Vermögen des ultravioletten Lichtes keineswegs vollständig ausgenützt wird, ein Umstand, welcher im wesentlichen auf eine ungeeignete Lage der Zuflußöffnung und der Ausflußöffnung des Bestrahlungsraumes zurückzuführen ist. Durch die in entgegengesetzter Richtung in den Bestrahlungszylinder stattfindenden Zuflüsse entstehen Wirbelbewegungen, die dazu führen, daß einige Portionen des zu bestrahlenden Wassers unnütz lange im Bestrahlungsraum verweilen, während andere, noch ganz ungenügend bestrahlt, durch das oben zwischen den Zuflußöffnungen angebrachte Ausflußrohr ablaufen. Es ist Sache der Technik, die Bewegung des Wassers im Bestrahlungsraum so zu regeln, daß die Wasserteilchen, etwa in gleicher Reihenfolge den Apparat wieder verlassen, in der sie in ihn eingetreten waren. Auf diese Weise würde allen Wasserteilchen eine möglichst langdauernde Strahlenwirkung zugute kommen. — Dann sind außerdem noch folgende Nachteile des Apparates hervorzuheben. Die Lage der Lampe selbst und der aus mehreren verschieden gerichteten Stäben bestehenden Lampenarmatur ist ebenfalls geeignet, die gewünschte regelmäßige Bewegung des Wassers im Zylinder zu beeinflussen. Als wenig geeignet muß der Umstand bezeichnet werden, daß die durch den Zylinder sich erstreckenden Elektrodendrähte von Kautschukschläuchen umhüllt sind. Ein weiterer Übelstand, auf den ebenso schon von anderer Seite hingewiesen ist, liegt darin, daß die Lampe vielfach schwer anzuzünden ist. — Da erfahrungsgemäß der Nogier-Triquetsche Apparat in den ersten Minuten seiner Inbetriebsetzung im allgemeinen kein sicher steriles Wasser liefert, ist anzuraten, die

Lampe zunächst mehrere Minuten bei gefülltem Zylinder, aber ohne Zufluß brennen zu lassen und erst dann zu öffnen, um das Wasser durch den Apparat gehen zu lassen.

2. Im Verhalten verschiedenartiger Mikroorganismen gegenüber der keimtötenden Wirkung der ultravioletten Strahlen haben die zu den Untersuchungen herangezogenen Testbakterien, und zwar B. coli commun., B. paratyphi B, Vibrio El-Tor und der sporenhaltige B. peptonificans keine größeren Unterschiede aufzuweisen gehabt; am empfindlichsten scheint El-Tor zu sein, während Coli und Paratyphus sich ziemlich gleich verhalten und B. peptonificans trotz seiner sonstigen Widerstandsfähigkeit ebenfalls abgetötet wird. Bei den Versuchen wurde zweifellos festgestellt, daß die Wasserbakterien gegen die vernichtenden Strahlen des ultravioletten Lichtes widerstandsfähiger sind als die angewendeten Testbakterien.

3. Um über den schädlichen Einfluß von Trübung und Färbung des zu sterilisierenden Wassers auf die Keimtötung durch ultraviolettes Licht ein Urteil abzugeben, hätten die Mängel des gebrauchten Apparates in stärkerem Maße ausgeschaltet sein müssen, welches aber im vorliegenden Falle unmöglich war. Aus den angestellten Versuchen läßt sich schließen:

a) Daß die durch Ton hervorgerufene Trübung des Wassers die keimtötende Wirkung herabsetzt. Wenn die Trübung nicht ganz besonders hohe Grade erreicht, kann unter den gegebenen Bedingungen dennoch eine recht beträchtliche Abnahme der Keimzahl erzielt werden. So stellten Trübungsgrade, die etwa 0,15 $BaCl_2$ im Liter (Durchsichtigkeitshöhe 2,6 cm) entsprechen, noch keineswegs ein absolutes Hindernis für diese Wirkung ein. Größere Mengen steriles Wasser wurden jedoch bei einem Trübungsgrade erzielt, der nur etwa 0,033 $BaCl_2$ im Liter (Durchsichtigkeitshöhe 10,6 cm) entsprach. Erst ein Trübungsgrad des zu bestrahlenden Wassers, der etwa 0,2 $BaCl_2$ im Liter gleichkommt, scheint die keimvernichtende Wirkung des Apparates ganz aufzuheben.

b) Wenn das zu bestrahlende Wasser mit großen Mengen Torfauszug versetzt war, so nimmt die keimtötende Wirkung des ultravioletten Lichtes ab. Bei geringeren Beimengungen von Torfauszug hat die Bestrahlung dennoch eine außerordentlich starke bakterizide Wirkung zu Folge. — Da Torfauszug mit dem Alter dunkler wird, so hat eine quantitative Beurteilung des zum Wasser zugesetzten Torfauszuges keinen Zweck und die von Grimm und Weidert durchgeführte Bestimmung des Sauerstoffverbrauches des zugesetzten Torfauszuges ist unter solchen Umständen zweckdienlicher. Aus den angestellten Versuchen läßt sich demnach schließen, daß eine nicht allzu große Menge von Huminsubstanzen in dem zu behandelnden Wasser die sterilisierende Wirkung der Bestrahlung nicht besonders stark beeinträchtigt, obgleich bei Verwendung von solchem Wasser es nur schwer gelingt, größere Mengen vollständig keimfrei mit dem verwendeten Apparat zu erzielen. — Nach verschiedenen weiteren Trübungsversuchen mit frisch gefälltem Ba SO_4 und Färbungen mit Vesuvin, welche 2—3mal stärker als die Tontrübungen und Torffärbungen waren, zeigte es sich, daß man es hierbei mit gewissen Stoffen zu tun hat, die in den Tonaufschwemmungen bzw. im Auszuge des Torfes vorhanden sind und die in irgendeiner Weise die keimtötende Wirkung des ultravioletten Lichtes beeinträchtigen.

4. Obige Ergebnisse, wie auch diejenigen von anderen Forschern zeigen, daß die ultravioletten Strahlen in ganz außerordentlich hohem Grade Bak-

terienkeime vernichten können. Es fragt sich nun, inwieweit diese sterilisierende Wirkung sich für praktisch-hygienische Zwecke verwerten läßt. Da aber der zur Verfügung gestandene Apparat nicht allen Ansprüchen genügte, so hat die Technik noch manche Aufgabe zu erfüllen, bevor eine vollständige Ausnützung der keimtötenden Wirkung der ultravioletten Strahlen gewährleistet wird.

Um aber der Technik bei Lösung dieser Fragen einen bestimmten Weg weisen zu können, ist noch festzustellen, welche Bedingungen die Strahlenwirkung vorteilhaft beeinflussen und welche Faktoren sie schädigen.

Die geradezu erstaunliche Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die Keimabtötung spricht dafür, daß die Wassersterilisation mit ihrer Hilfe zu den wirksamsten Assanierungsmaßregeln der Zukunft gehören wird.

Rullmann (Darmstadt).

Hairi, Ekrem, Über den Einfluß der organischen Substanzen auf die Desinfektion des Trinkwassers mit Chlor. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 75. 1913. p. 40—49.)

Aus mehreren Arbeiten über obiges Thema ergab sich, daß, ebenso wie bei Verwendung von Sublimat, die Anwesenheit organischer Substanzen die Wirkung von Chlor hemmen kann. Zum Beweise führt Verf. diesbezügliche Veröffentlichungen an, die zeigen, daß bei einem größeren Gehalte des Wassers an solchen Substanzen ein erhöhter Chlorzusatz erforderlich ist. Während die meisten Autoren sich dieser Ansicht zuneigen, richtet Lowther den Chlorzusatz nach der Zahl der Bakterien. Nach des Verf. Anschauung ist solches jedoch unrichtig, da Rubner nachgewiesen hat, daß die Keime nur rund 0,0001 Proz. des Gewichtes der gesamten organischen Substanzen eines normalen Wassers ausmachen. Es muß daher bei der Desinfektion eines Wassers mit Chlor die Zusatzmenge des letzteren nach den organischen Substanzen gerichtet werden und man muß zunächst ermitteln, welche Mengen zur Abtötung aller sporenfreien Keime erforderlich sind. Sind aber Desinfektionen rasch auszuführen, dann ist solches nicht möglich, ebenso können z. B. zeitweilig Industriewässer in den Fluß eingelassen werden und so ein Wasser von wechselnder Beschaffenheit entstehen. Es muß dann also die Menge der organischen Substanz direkt bestimmt werden. — Von den zwei Methoden zur Bestimmung dieser Substanzen in der Praxis kann die eine, die Bestimmung des Glühverlustes, für diese Zwecke nicht in Betracht kommen und angeführte Versuche des Verf. zeigen, daß sie falsche Resultate geben würde; stets wird daher die zweite Methode, die Bestimmung der Oxydierbarkeit durch Kaliumpermanganat, angewendet. Nach den Untersuchungen von Lode und andererseits von Grimm hat sich aber keine Gleichmäßigkeit zwischen Permanganatverbrauch und hemmender Wirkung ergeben und frühere Beobachtungen zeigten, daß verschiedene Substanzen durch Kaliumpermanganat ganz verschieden oxydiert werden. Eine beigefügte Zusammenstellung (p. 42) zeigt, daß manche Stoffe fast ganz, andere zu 50 Proz., andere nur zu 10 Proz. und andere gar nicht hierdurch oxydiert werden.

Um festzustellen, ob sich diese Stoffe gegen Chlorkalk möglicherweise anders verhalten und infolgedessen aus den üblichen Bestimmungen der Oxydierbarkeit sich keine Schlüsse auf die hemmende Wirkung von Chlorkalk ziehen lassen, führte Verf. eine große Reihe von Untersuchungen aus. So benutzte er nach der Grimmschen Versuchstechnik u. a. Weinsäure, Harnstoff und Traubenzucker und ermittelte für erstere eine äußerst schwach hemmende Wirkung, während Harnstoff eine ziemlich starke zeigte. Die interessanten Einzelheiten sind aus den Seiten 42—47 ersichtlich:

Die Ergebnisse faßt Verf. in den drei Sätzen zusammen:

1. Ein Wasser, welches größere Mengen organischer Substanzen enthält, verbraucht bei seiner Desinfektion mit Chlor größere Mengen von diesem, als ein Wasser, das ärmer daran ist.

2. Aus der Bestimmung der organischen Substanzen mit Kaliumpermanganat können keine Schlüsse auf die hemmende Wirkung gezogen werden.

3. Viel bessere Resultate ergibt die Bestimmung der chlorbindenden Kraft. Rullmann (Darmstadt).

Thiersch, Über die verschiedenen Verfahren zur Reinigung von Abwässern (Jahresber. d. Gesellsch. f. Natur- u. Heilk. in Dresden. Sitzungsper. 1911/12. 1912. p. 81—88).

Verf. betrachtet nur die häuslichen (nicht gewerblichen) Abwässer. Vorbildlich war England. Hier kam das Rieselverfahren in Anwendung, doch ging man von ihm ab, da die Erwerbung des Grundes zu teuer kam. Man griff zu den Klärmethoden mit chemischen Mitteln und zu dem künstlichen biologischen Verfahren, das darin besteht, das vorgereinigte Abwasser über sogenannte Oxydationskörper (hartes, poröses Material, 1—2 m hoch geschichtet) zu leiten. Deutschland verfügt zwar über reichlichere Wassermengen als England, doch beträgt die Menge der jährlich zu klärenden häuslichen Abwässer etwa 5 Millionen Kubikmeter. Die Menge der ungelösten Bestandteile des Abwassers wird auf etwa 21 kg pro Kopf und Jahr berechnet. Die Selbstreinigung der Flüsse spielt aber auch in Deutschland eine geringe Rolle, da schon in ein bestimmtes Gebiet verschmutztes Wasser ankommt und der Winter für die Selbstklärung ein großes Hindernis ist. Rieselfelder bewährten sich an vielen Orten in Deutschland. Mag man auch für die Herrichtung pro Hektar 2000—5000 Mark rechnen, so ergibt sich durch den Ertrag an Futtergras, Gemüse und anderen Kulturgewächsen doch ein recht ansehnlicher Reingewinn. Auf jeden Fall liefern die Rieselfelder die vollkommenste Klärung, da gibt es keine Vergeudung von Dungstoffen. Nachdem Verf. auf den von Imhoff konstruierten sogenannten Emscher Brunnen eingeht und das künstliche biologische Verfahren nach Dunbar und König erläutert (das beste mechanische Verfahren zur Vorreinigung), sagt der Verf., daß bei schlechten Vorflutern stets das biologische Verfahren anzuempfehlen ist. Matouschek (Wien).

Morse, John Lovett, Sterilization, Boiling and Pasteurization of Milk. (Journ. Amer. Med. Assoc. Vol. 60. 1913. p. 875.)

The first part of the article contains summaries of the findings of several authors as to the changes produced in milk by heat. The changes relate to appearance, taste, smell, chemical composition, the destruction of ferments, the bactericidal action, the precipitin reaction, the destruction of bacteria etc. General reference is made to Flügge's work on spore bearing bacteria in milk. The writer states that there is not sufficient evidence to show that heated milk is the cause of ricketts or scurvy and that most ferments resist at least low pasteurization temperatures. The cooking of milk is advised as a routine measure, for granting that the cooking of milk does make it some what less digestible and that its continued use does predispose to the development of the diseases of nutrition, it is evident that the disturbances which it causes are slight and insignificant in comparison with the diseases caused by milk contaminated with bacteria. Pasteurization of milk is then discussed and the conclusion reached that pasteurization is preferable to boiling. Of the three methods of pasteurization now practised pasteurization in the final package is the best. Pasteurization by the continuous process is preferable to the the flash or discontinuous process. For continuous pasteurization the temperature recommended is 30 minutes at 145° F. (62,7° C.). The article concludes with giving directions for home pasteurization of milk.

P. G. Heinemann (Chicago).

Anonym, Milcherhitzung und Kannendämpfung. (Molkerei- u. Käserei-Zeitg., Liegnitz. Jahrg. 7. 1913. p. 241.)

In diesem Artikel ist die Methode der Kannendesinfektion mittels kochend heißer Sodalösung durch die Arbeiter im Großbetriebe als unausführbar hingestellt. Ebensowenig praktisch durchführbar erscheint das in dem neuen Viehseuchengesetz auch zugelassene Verfahren mittels Kalkmilch, weil die Arbeiter in der kurzen Zeit die Kannen nicht gründlich genug nachspülen würden. Die einzig mögliche Art von den in dem Gesetze zugelassenen Methoden des Desinfizierens der Milchkannen sei die Behandlung mittels Dampf, was aber in Kostenpunkt und Mangel an einem geeigneten Apparat seine Schwierigkeit hätte.

Wolff (Kiel).

Das Kristall-Milchfilter. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 148.)

Bestes Filtermaterial für Milch ist bis heute Watte. Bei dem Kristallmilchfilter aber erfolgt die Filterwirkung, d. h. die getrennte Abscheidung derjenigen feinen Schmutzteilchen, die ein spezifisch größeres oder geringeres Gewicht wie die Milch haben, nach dem Prinzip der Selbstklärung, ähnlich der Wasserselbstreinigung nach biologischem System. Abteilungen und Scheideflächen bewirken in vielfacher Wiederholung eine Trennung und Ablenkung in entgegengesetzter Richtung und zwar der schwereren Schmutzteilchen nach unten, der leichteren nach oben. Wichtig erscheint, daß auf diese Weise die Milch auch von den spezifisch leichteren Schmutzteilchen befreit wird, die bei Entrahmungsmaschinen stets in den Rahm übergehen, und gleichfalls deren Menge bestimmt werden kann. Zur Erzielung der rauhen weichen Flächen, welche zum Festhalten der Schmutzteilchen dienen, kann Baumwolle, gekrepptes Pergament oder Fließpapier, eventuell auch unten eine dünne Schicht von Kies, Porzellan- oder Glasschrot verwendet werden; am besten eignen sich Baumwolltücher, die nach jedem Gebrauch ausgekocht werden können.

Das Kristallmilchfilter wird von der Spezialfirma für Molkereieinrichtungen C. H. von Stein & Co., Düsseldorf-Oberkassel, auf den Markt gebracht.

Wolff (Kiel).

Kennerknechts abnehmbarer **Flaschenverschluß** (D. R. P. und D. R. G. M.). (Molkerei-Ztg. Hildesheim Jahrg. 27. 1913. p. 197.)

Dieser Verschluß dient Sterilisierzwecken und eignet sich für zum Versand bestimmte Flaschen. Es ist eine Art Bügelverschluß, bestehend aus Sterilisierriegel und Sicherheitsriegel. Zum Sterilisieren wird lediglich der erstere geschlossen, weil dieser nur einen geringen Druck ausübt, wodurch die sich eventuell noch entwickelnden Dämpfe entweichen können.

Wolff (Kiel).

Lobeck, O., Neues Verfahren zum Entkeimen von Milch. (Molkerei- u. Käserei-Zeitg., Liegnitz. Jahrg. 7. 1913. p. 242 u. Berlin. Molk.-Zeitg. Jahrg. 23. 1913. p. 157.)

Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß vom Sammelbehälter kommende Milch mittels Druckpumpe in ein Druckgefäß etwa unter 4 Am. Druck gebracht, dann im Entkeimer sekundenweise auf 73—75° C im Sprühzustande indirekt erhitzt, sofort abgekühlt und event. anschließend hieran auf Flaschen oder in die zum Verkauf bestimmten Kannen gebracht wird (Gesellschaft f. Molkerei-Fortschritte m. b. H., Leipzig). Das erhaltene Produkt gibt alle Reaktionen einer Rohmilch. Die vegetativen Keime, speziell Krankheitserreger, sind abgetötet, nicht aber allerdings die Sporenbildner. Das Verfahren eignet sich für Herstellung von Säuglingsmilch, bakterienfreier Magermilch, keimfreiem Quark usw., ferner Kefir, Yoghurt, desgleichen in der Butterei und Käserei. Auch auf weitere Vorteile ist hingewiesen.

Wolff (Kiel).

Backhaus, Über Kindermilchbereitung nach 20-jähriger Erfahrung. (Molkerei-Ztg. Berlin. Jg. 23. 1913. p. 217.)

Bekanntlich hat Verf., und zwar unter den Prinzipien:

1. Fabrikweise Herstellung im Gegensatz zur Hausverarbeitung;
2. sorgfältige Gewinnung der Rohmilch;
3. chemische Veränderung der Kuhmilch auf die Zusammensetzung der Frauenmilch;
4. Füllung in Portionsflaschen;
5. Sterilisation;
6. sachgemäße Verabreichung, bereits vor Jahren eine rationelle Kindermilchbereitung in die Milchwirtschaft eingeführt, welche von Prof. Runge in Göttingen „Backhaus-Milch" benannt wurde. Im Laufe der Zeit wurde, den wissenschaftlichen Fortschritten entsprechend, das Verfahren verändert. Das Verfahren hat sich, wenn aus den verflossenen 20 Jahren auch nachteilige Momente zu berichten sind, im allgemeinen bewährt. Verf., der laut Äußerung „auf dem Standpunkte jenseits von Gut und Böse" angekommen ist, erörterte die oben genannten einzelnen Punkte des Verfahrens.

Zu Punkt 1 fügt Verf. begründend hinzu, daß in privatem, leistungsfähigem Großbetrieb unter wissenschaftlicher Kontrolle gearbeitet werden sollte. Bei Punkt Erörterung von 2 (sorgfältige Gewinnung) fordert Verf. mehr Verständnis für die hier vorliegenden Aufgaben in der milchwirtschaftlichen Praxis und Kontrolle von absolut sachverständiger Seite. Bezüglich „sachgemäße Verabreichung" ist empfohlen, daß diese stets unter Kontrolle des Arztes geschehen müsse. Zum Schluß spricht Verf. über die Organisation seines Unternehmens. Wolff (Kiel).

Denkschrift des Deutschen Milchwirtschaftlichen Vereins über die Errichtung einer wissenschaftlichen Anstalt für die deutsche Milchwirtschaft. (Mitt. d. D. M. V. Jg. 30. 1913. p. 54.)

Diese Denkschrift enthält eine allgemeine Aufklärung über die genannte Angelegenheit und erörtert 1. das Verlangen nach der Anstalt, dem bereits im Jahre 1903 Ausdruck gegeben wurde, das sich dann von verschiedener

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Seite wiederholte und in neuerer Zeit ganz besonders lebhaft diskutiert wurde (cf. Literaturangaben, insbesondere die Ausführungen von Prof. Dr. Weigmann-Kiel in den Schriften des D. M. V. und in Fachzeitungen); 2. Den Zweck der Anstalt, die zur Förderung der gesamten Milchwirtschaft Deutschlands in gesundheitlicher, technischer, gewerblicher und volkswirtschaftlicher Hinsicht berufen ist. 3. Die einzelnen Aufgaben der Anstalt, a) betreffend die Milchgewinnung, b) die Milchverarbeitung, c) die Milchwirtschaft in engerem Sinne, d) die Prüfung von Milch und von Molkereierzeugnissen, e) die Gesundheitspflege. Es sind beispielsweise ca. 30 Fragen zu Punkt 3 aufgeworfen, von denen jede einzelne, auch speziell molkereibakteriologische, höchst interessant erscheint. Dazu kommen unter weiterem auch Fragen Volkswirtschaft und Volkswohlfahrt betreffend. 4. Die erforderlichen Einrichtungen der Anstalt. 5. Die Schaffung derselben. 6. Einwendungen dagegen und 7. die Betonung des notwendigen Bedürfnisses eines solchen freien deutschen Hochstifts der Milchwirtschaft, das unschwer ins Leben zu rufen ist und für das alle die zur Milchwirtschaft Beziehung haben, was fast für jedermann zutrifft, eintreten sollten und müßten. Wolff (Kiel).

Eichloff und **Beer,** Milchkonservierungsmittel „Doux“. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 411.)

„Doux“ ist nichts anderes als eine Lösung von verunreinigtem H_2O_2 und ist natürlich seine Anwendung zum Frischerhalten der Milch ebenfalls gesetzlich verboten. Wolff (Kiel).

Hering, F., Über hygienisch einwandsfreie Milchaufbereitung. (Milchw. Centralbl. Jahrg. 42. 1913. p. 396.)

In der Hauptsache bespricht Verf. in seinem allgemein interessierenden Vortrag das neue Milchentkeimungsverfahren von Dr. Lobeck-Leipzig vermittels des „Biorisators“, wonach Milch durch einen Sprühapparat nebelfein zerstäubt, einem Hitzegrad von 72—75° C. ausgesetzt wird. Diese „Enzymamilch“ behielt alle Vorteile einer ungekochten Milch. Verf. verspricht diesem Verfahren aus dargelegten Gründen eine große Zukunft. (Natürlich resistieren aber die sporenbildenden Bakterien, die pathogenen Keime werden allerdings abgetötet. D. Ref.) Verf. empfiehlt auch die Seihschleuder „Albissa“, deren Wirkung auf dem Prinzip des Wattefilters beruht.

Wolff (Kiel).

Kühl, H., Untersuchungen über die Konservierung der Butter (speziell für Tropenversand). (Deutsche Vierteljahresschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. 1913. p. 261 jf.)

Verf. hat seiner Veröffentlichung die in den Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 1905 niedergelegten Untersuchungen von A. Kraus „über den Einfluß der Herstellung, Verpackung und des Kochsalzgehaltes der Butter auf ihre Haltbarkeit, mit besonderer Berücksichtigung des Versandes in die Tropen“ zugrunde gelegt. — Bei der immer noch zunehmenden Wichtigkeit dieses Gegenstandes wurden nochmals in eingehender Weise die zu stellenden Anforderungen an feine Butter besprochen, wobei besonders die Haltbarkeit eine sehr wichtige Rolle spielt und infolgedessen alles erwähnenswerte bezüglich der Dauerbutter, so besonders die Verpackung, angeführt wird. Trotz aller Vorsichtsmaßregeln ist nach den bisherigen Erfahrungen auch die auf das sorgfältigste hergestellte Dauerbutter unverändert nur kurze Zeit haltbar und der in dieser Frage interpellierte maßgebende Norddeutsche Lloyd gibt auf Grund seiner reichen Erfahrungen an, daß gute Tafelbutter mit 2 Proz. Kochsalz sich im Kühlraum oder Eiskeller aufbewahrt, durchschnittlich nicht länger als drei Monate tadellos hält. Schwer zu verhindern ist das Rosten oder Korrodieren der selbst best verzinnten Blechgefäße. Bessere Erfolge wurden durch Einfüllen der Butter in Weinflaschen beim Transport in heiße Länder erzielt; immer aber muß auf Aufbewahrung im Kühlraum, luftdichten Verschluß und Fernhaltung der Lichtstrahlen gesehen werden. Zwei schädigende Einflüsse, die sich meistens gleichzeitig geltend machen, sind stets zu berücksichtigen, die Einwirkung des Luftsauerstoffes auf das Butterfett und damit Hand in Hand gehend die Zersetzung durch Schimmelpilze und Bakterien, welche zuerst die Eiweißstoffe und dann auch das Fett angreifen. Nach Kraus war von bester Qualität die aus zweimal pasteurisiertem saurem Rahm hergestellte und mit 3 Proz. Kochsalz versetzte Probe, die in einem Glasgefäß im Kühlraum des Schiffes verschickt worden war. Auch von anderer Seite wurde eine derartig hergestellte Dauerbutter als beste bezeichnet. Verschiedenartige Zusätze, wie Borax, Zucker u. a. waren einesteils gesetzlich verboten, andernteils unzweckmäßig.

Nach dieser Einleitung geht Verf. auf seine eigenen Versuche über, die er mit den ihm von der Firma J. Weck in Öftingen zur Verfügung gestellten Gläsern und Apparaten in vier Versuchsreihen ausführte. Folgende Sätze enthalten die Ergebnisse:

Es ist nicht möglich, durch Pasteurisieren eine Butter lange Zeit unter ungünstigen Temperaturverhältnissen in unveränderter Qualität zu erhalten, selbst dann nicht, wenn man pasteurisierte Milch zum Aufarbeiten des Butterfettes verwendet. Die besten Erfolge mit pasteurisierter Butter wurden in der dritten Versuchsreihe erzielt, wo die in Weckgläsern an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jedesmal 25 Minuten pasteurisierte Butter bei meist + 15° C nicht überschreitender Temperatur aufbewahrt und mit zweimal pasteurisierter Milch verarbeitet wurde. Die ungenügende Haltbarkeit des an sich guten Produktes (Versuch 2) führt Verf. darauf zurück, daß im Butterfett suspendierte Eiweißpartikelchen leicht der Zersetzung unterliegen und zwar können biologische und rein chemische Ursachen hier vorliegen. So erklärt es sich, daß das durch Seihen von diesen Eiweißflocken befreite Butterschmalz sich gut hält. Nach Kühls Versuchen scheint es am besten zu sein, nicht die Butter, sondern das reine Butterfett für den Versand zu pasteurisieren und nachfolgend wieder mit Milch und zwar am besten sterilisierter Milch zu emulgieren, indem man das Butterschmalz mit 15 Proz. Magermilch kräftig durchschüttelt, durch Eingießen in Eiswasser abkühlt, von neuem emulgiert und somit in Butter überführt. — Sehr wichtig ist die Aufbewahrung im lichtgeschützten Kühlraume. Nach Wacker ist das Butterfett gegen Lichtstrahlen noch empfindlicher als die Butter selbst. Schon nach kurzer Zeit tritt eine oberflächliche Verwandlung des Butterfettes ein, es nimmt talgigen Zustand an, ohne daß chemische Unterschiede gegenüber einer vor Licht geschützt aufbewahrten Butter nachweisbar sind. Möglicherweise handelt es sich hierbei um chemisch-physikalische und nicht um biologische Veränderungen. Wird aber ein solches, im Innern völlig unverändertes, oberflächlich aber talgiges Butterfett geschmolzen, dann nimmt die ganze Masse in kurzer Zeit einen gleichmäßig talgigen Geschmack an, welcher den Wert der Butter sehr herabsetzt.

Rullmann (Darmstadt).

Lyon, T. Lyttleton, and **Bizzell, James A.,** Water-soluble matter in soils sterilized and reinoculated. (Cornell University Stat. Bull. 326. 1913.)

Jars of soil were steamed and after cooling were either inoculated with fresh soil or with heated soil, or were left uninoculated. The soluble matter, of which partial analyses are given, disappeared most rapidly in all steamed soils inoculated with fresh soil, but the rate of its disappearance gradually diminished until at the end of six and one-half months there was more soluble matter in the soil inoculated with fresh soil than in either the uninoculated soil or in that inoculated with heated soil. Plants grew best in the inoculated soil. „Since the evidence points strongly to toxic matter as being the controlling factor in the productivity of steamed soils, it seems that there must be a fundamental difference in these soils in respect to the nature of the toxic matter formed when steamed and to its elimination afterwards."

Kellerman (Washington).

Hesselink van Suchtelen, Methode zur Gewinnung der natürlichen Bodenlösung. (Journ. f. Landwirtsch. Bd. 60. p. 369.)

Verf. empfiehlt zur Gewinnung der Bodenlösung in ihrer natürlichen Zusammensetzung folgendes Verfahren:

Ein großes Buchner-Filter wird mit entsprechend gereinigtem Asbest beschickt. Die ziemlich feuchte Erde, deren Wassergehalt bekannt ist, wird auf den Asbest geschichtet und mit einem Gummistopfen leicht angedrückt. Dann wird abgekühltes Paraffinöl aufgegossen, so daß die ganze Oberfläche damit bedeckt ist, worauf man die Wasserstrahlpumpe schwach saugen läßt. Die so erhaltene Flüssigkeit wird in der Saugflasche zur Verminderung der Viskosität kurze Zeit auf 40° C erwärmt, danach vorsichtig in ein spitzes Gefäß gegossen und, um das Absetzen zu beschleunigen, darin ein paar Minuten mit mäßiger Schnelligkeit zentrifugiert. Mittels eines Scheidetrichters wird das schwerere Wasser von dem leichteren Paraffin entfernt.

Es hat sich bereits gezeigt, daß die in verschiedenen Erden enthaltenen Flüssigkeiten in ihrer Zusammensetzung Unterschiede aufweisen, die erfahrungsgemäß Pflanzen- und Bakterienleben beeinflussen müssen.

Vogel (Bromberg).

Laifle, X., Zur Theorie und Praxis der Formaldehyd-Vakuum-Desinfektion. (Gesundheitsingenieur. 1912. No. 40.)

Die umfangreiche und sorgfältig ausgeführte Arbeit bringt viele neue für die Desinfektionstechnik wichtige Einzelheiten.

Im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen geht Laifle auch auf die physikalische Seite der Desinfektionsfrage genauer ein und betont, daß die äußere Schädigung der zu desinfizierenden Gegenstände vermieden werden müsse, wie solches bei den geschlossenen Apparaten unvermeidlich sei. Die Schädigung der Gegenstände wird aber nicht durch die Dämpfe als solche, sondern durch die hohe Temperatur herbeigeführt; konnte man Dämpfe von so niederer Temperatur erzeugen, daß ohne Schädigung der infizierten Sachen eine gleiche Desinfektionswirkung wie bei hohen Temperaturen erzielt wurde, so war das Problem der Keimvernichtung bei niederen Temperaturen gelöst. So wurde denn der von R. A. Hartmann-Berlin konstruierte Apparat, welcher sowohl für Formaldehyd-Vakuum-Desinfektion als auch für Dampfdesinfektion eingerichtet ist, vom Verf. einer auf längere Zeit sich erstreckenden Prüfung unterzogen und zunächst Studien über die durch

Luftdruckerniedrigung entstehenden Differenzen der Dampftemperatur angestellt. Dann folgt die genaue Beschreibung des durch Abbildungen veranschaulichten Hartmannschen Apparates, woran sich Angaben über Vakuummeter, die Übereinstimmung von Druck und Temperatur, sowie die Temperaturverhältnisse im Apparate anreihen; über letztere berichtet eine beigegebene sehr ausgedehnte Tabelle. Vor Laifle haben im Jahrgang 34, No. 19 derselben Zeitschrift die Militärärzte Mayer und Waldmann gleichfalls Desinfektionsversuche veröffentlicht, deren Vorschriften für die Durchführung der Desinfektion gleichfalls vom Verf. angeführt und besprochen werden. Hieran schließen sich Angaben über die Konzentration der Dämpfe. Sehr wichtig ist das Zurückbleiben von Formaldehydresten in den Objekten; wegen der verhältnismäßig geringen Kraft, die zur Austreibung der Luft aus dem desinfizierten Gegenstande zur Verfügung steht, darf die Schichtdicke der Objekte nicht allzu groß sein, weil sonst die Reibungswiderstände größer sind als die treibende Kraft, so daß sich hieraus gewisse Grenzen ergeben für die zur Beschickung des Apparates geltenden Regeln. — Zu den Versuchen wurden die verschiedensten Objekte verwendet und so kam es, daß nicht jedesmal nur neue, sondern auch alte, zur Formaldehyddesinfektion schon benutzte Gegenstände, wie z. B. Decken, in Anwendung kamen. Hierbei machte Verf. die Beobachtung, daß wiederholt benutzte Decken bessere Resultate ergaben als neue, so daß die Annahme begründet erscheint, daß in den bereits desinfizierten Sachen trotz mehrtägiger Lüftung vor wiederholtem Gebrauch noch ein Rest des Desinfizienz zurückbleibt und so die Einwirkung der erneuten Desinfektion verstärkt, obgleich durch den Geruchssinn kein Formaldehyd mehr erkennbar ist. Die Tatsache der Formaldehydnachwirkung wurde übrigens schon von Sobernheim und Seligmann bei Desinfektion von Büchern festgestellt; sie infizierten die Seiten eines Buches, welches drei Wochen vorher desinfiziert worden war, mit Staphylokokken, Typhus und Paratyphus B und nach 3 Stunden wurden die infizierten Stellen herausgeschnitten und in Bouillon eingesät, wobei sich die Abtötung von Typhus und Paratyphus B ergab, während die Staphylokokken nach 48 Stunden, wenn auch nur kümmerlich, wuchsen. Ähnliche Feststellungen machte der Verf.

Interessante Beobachtungen folgen sodann über das Verhalten verschiedener Objekte, da sich ergeben hatte, daß das verwendete chemische Agens durchaus nicht einflußlos auf die Farben und Stoffe derselben blieb. Es ergibt aber die Tabelle der zahlreich untersuchten Objekte, daß die Farbenunterschiede mit Ausnahme von unechter Silberschnur so geringfügig waren, daß sie nur durch sorgfältigsten Vergleich mit nicht desinfizierten gleicher Art festzustellen waren. Wirklich geschädigt waren nur nicht gefettetes Brandsohlenleder und auch bei Fellen war eine Schädigung nicht unerheblich.

Wir kommen nun zur Prüfung des uns am meisten interessierenden Sporenmaterials, auf dessen zahlreiche Einzelheiten genauer einzugehen leider der zugewiesene Raum verbietet. Verf. gibt an, daß die Resistenzgrenze gegen Formaldehyd bei den einzelnen Sporenarten ziemlich nahe zusammen liegt, bei den einzelnen Rassen jedoch gewissen Schwankungen unterworfen sei und daß daher neben Sporen von hoher Resistenz gegen Dämpfe auch Milzbrandsporen zu verwenden seien. Sind dann bei der Desinfektionsprüfung die Milzbrandsporen abgetötet, die anderen Sporenarten aber nicht, dann ist sicher, daß der Apparat bei diesem Versuche an der Grenze seiner

Leistungsfähigkeit angekommen ist. Sollten aber die Milzbrandsporen gewachsen sein, während die anderen abgetötet sind, dann weiß man, daß zur verlangten Wirkung nur wenig mehr fehlte; bei Abtötung beider hat man einen Sicherheitszuschlag. Die Herstellung der infizierten Seidenfäden geschah in bekannter Weise, und bei Anwendung verschiedener Herstellungsarten zeigte sich, daß solches bezüglich der Resistenz gleichgültig war. Die Beobachtungszeit betrug 4 Wochen; Milzbrand ging nie später als am 4. Tage an, während bei den anderen noch nach 14 Tagen Wachtum beobachtet wurde.

Bezügliche der Desinfektionszeit muß jedenfalls nach Laifle die Dauer von zwei Stunden bei 45—48° als erforderlich bezeichnet werden, in der allgemeinen Praxis aber hält er 3 Stunden 10 Minuten für nicht zu lang. Bei geringer Temperaturerhöhung fand er bei einzelnen Versuchen, daß bei einer Apparat-Innentemperatur von 48—50° anderthalb Stunden an Zeit ausreichten. — Die Notwendigkeit eines einheitlichen Desinfektionsobjektes für eine vergleichende Apparatenprüfung glaubt Verf. betonen zu müssen; er verwendete als am besten hierzu geeignet gleich große Stücke eines genau beschriebenen Wollengewebes, zwischen dessen einzelnen Lagen die Sporenpakete eingelegt wurden. — Dann wurden auch der Desinfektion ohne kontinuierliche Evakuation und schließlich der Rückgewinnung der benutzten Formalinlösung noch besondere Abschnitte gewidmet.

Als Ergebnis seiner Prüfung des Apparates von R. A. Hartmann gibt Laifle an, daß die Desinfektion bei 45—50° ohne nennenswerte Schädigung auch der am meisten empfindlichen Objekte möglich ist. Die desinfizierende Wirkung ist groß genug, um bei den in Frage kommenden Objekten, wie Federbett, Matratze, Wolldecke, Schuhzeug und Kleidern alle Keime zu töten. Ferner kann ein Mann die Bedienung ausführen. Den von Mayer und Waldmann geprüften Apparaten von Lautenschläger und Schmidt-Weimar kommt der Hartmannsche Apparat dem ersteren an Tiefenwirkung und Schonung empfindlicher Objekte gleich, den zweiten Apparat aber übertrifft der Hartmannsche an Schonung der zu prüfenden Objekte, weil zu hohe Temperatur im Schmidtschen vorwaltet und seine Desinfektionswirkung zurücksteht. Einzelne kleine Verbesserungen, welche im Originale angegeben sind, sind noch anzubringen.

Rullmann (Darmstadt).

Originalreferate aus bakteriologischen und gärungsphysiologischen etc. Instituten, Laboratorien etc.

Aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.

Lindner, P., und **Grouven, O.,** Inwieweit findet eine Beeinflussung der Desinfektionswirkung verschiedener Antiseptika durch gesteigerte Hefemengen statt?[1])

Will hatte beobachtet, daß durch Zugabe einer größeren Hefenmenge zu einem Desinfektionsmittel dessen Wirksamkeit beeinträchtigt werden kann. Diese Beobachtung wurde nachgeprüft, es kamen dabei als Desinfektionsmittel Formalin, Antiformin, Fluorammonium in 1-, 2- und 5-proz.

---

[1]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 133—135.

Lösungen und Sublimat 1 : 1000 zur Verwendung. Bei der Ausführung der Versuche wurde die Einwirkung von einer von Will studierten untergärigen Heferasse, einer weiteren untergärigen Bierhefe, sowie von Saccharom. validus, S. turbidans und S. cratericus, die in Mengen von 1, 2. 4, 5 und 10 g auf 100 ccm der Lösungen der genannten Desinfektionsmittel beobachtet.

Die Willsche Mitteilung, soweit sie sich auf dessen Heferasse bezog, fand ihre Bestätigung: diese Hefe erwies sich als besonders widerstandsfähig und als jedenfalls widerstandsfähiger als die zweite untersuchte Bierhefe. Im übrigen waren die Ergebnisse, anscheinend wegen zu starker Konzentration der Desinfektionsmittel-Lösungen, zum großen Teil negativ, denn es gelang nur in wenigen Fällen, den Moment festzustellen, in dem die Desinfektionswirkung aufhörte, eine vollständige zu sein.

Lindner, P. und **Schmidt, O.,** Die Widerstandsfähigkeit eines bei verschiedenen Temperaturen herangezüchteten Hefenmaterials gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln und der Einfluß der Temperatur während der Einwirkung der letzteren[1]).

Die Verff. prüften die Widerstandsfähigkeit von vier verschiedenen Hefen gegenüber Sublimat, Formalin, Antiformin und Fluorammonium bei den Wachstumstemperaturen von 10,15 und 25° in Bierwürze und Würzegelatine. Die Ergebnisse sind wie folgt zusammengefaßt:

1. Die bei verschiedenen Temperaturen gezüchteten Hefen besitzen gegenüber einem und demselben Desinfektionsmittel verschiedene Widerstandsfähigkeit.
2. Die optimale Temperatur für die Züchtung des widerstandsfähigsten Materials ist bei den verschiedenen Hefen verschieden.
3. Das auf Würzegelatine gewachsene Material kann infolge seiner Neigung zur Klumpenbildung nicht zur einwandsfreien Feststellung der keimtötenden Kraft der Desinfektionsmittel verwandt werden.
4. Die Zerstörungskraft der untersuchten Desinfektionsmittel wird durch Temperaturen, die zwischen 10 und 25° liegen, nicht merklich beeinflußt.

Schönfeld, F. und **Hoffmann, K.,** Ozon als Desinfektionsmittel in der Brauerei[2]).

Die Verff. stellten sich die Aufgabe, früher veröffentlichte Untersuchungen nachzuprüfen, deren Ergebnisse, von Moufang und von Vetter mitgeteilt, das Ozon als ein in der Brauerei brauchbares Desinfektionsmittel erscheinen ließen, während Will zu im großen Ganzen entgegengesetzten Schlüssen gekommen war. Die Verff. gelangen auf Grund ihrer sehr umfangreichen im praktischen Betriebe durchgeführten Versuche dazu, sich Will's Ansicht anzuschließen. Die Verwendung von Ozon zum Zwecke der Sterilisierung von Leitungen, Fässern, Filtermassen und zur Vernichtung von in der Anstellhefe vorhandenen schädlichen Organismen kann nicht als zweckmäßig angesehen werden; lediglich zur Bereitung keimfreien Wassers verspricht die Verwendung von Ozon unter geeigneten Vorbedingungen Erfolg.

---

[1]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 249—251, 265—268.

[2]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 261—265, 276—279.

Nagel, C., Furfurol, seine Entstehung, sein Verbleib und Nachweis, besonders in bezug auf den Brauereibetrieb[1]).

Verf. bringt eine Zusammenstellung der zahlreich vorliegenden Untersuchungsergebnisse über die Bildung und Umsetzung usw. in den Zwischenprodukten und Erzeugnissen der Gärungsgewerbe unter besonderer Berücksichtigung der Brauerei.

Lindner, P. und Genoud, E. G., Zur Charakteristik der Willia belgica und einiger Hefen aus belgischem Lambicbier[2]).

Die Verff. haben die von Lindner im Jahre 1889 aus Brüsseler Bier isolierte und in ihren Eigenschaften teilweise von ihm bereits früher geschilderte[3]) **Willia belgica**, sowie drei aus Lambic neu isolierte Hefen: **Saccharomyces bruxellensis** (Lindner), **Mycoderma lambica** (L.) und **Mycoderma vanlaeriana** (L.) eingehend nach der morphologischen und der physiologischen Seite untersucht und beschrieben. Besondere Berücksichtigung erfuhr hierbei das Verhalten der genannten vier Organismen gegenüber den verschiedenen Zuckerarten.

Willia belgica bildet nach dreiwöchigem Wachstum auf 6-proz. Würzegelatine die dieser Gattung eigentümlichen hutförmigen Sporen, sie vermag Alkohol kräftig zu assimilieren. **Saccharom. bruxellensis** ist eine dem Typus Frohberg angehörende untergärige Kulturhefe mit lebhafter Neigung zur Sporenbildung. **Mycoderma lambica** ist eine kleinzellige, Würze leicht trübende und nur die Dextrose der Würze vergärende Art, sie bildet nach wenigen Tagen auf der Oberfläche dieses Nährsubstrats ein elastisches graues Häutchen. **Mycoderma vanlaeriana** hat unter dem Mikroskop das für eine Kahmhefe typische Aussehen, sie bildet in verhältnismäßig kurzer Zeit auf gehopfter Würze eine weiße mehlige Haut, sie assimiliert Alkohol.

Rommel (Berlin).

Referate.

Moufang, E., Über eine katalytische Wirkung toter Hefezellen auf die Gärung[4]).

Angeregt durch eine ältere Arbeit von A. J. Brown, untersuchte Verf. den Einfluß von durch Maischen von frischer Hefe gewonnenen Hefewässern auf gärende Bierwürze. Irgendwelche Beeinflussung der Gärintensität usw. wurde hierbei nicht beobachtet, dagegen üben durch Kochen abgetötete und vollständig ausgewaschene Hefezellen eine starke Wirkung — Verf. nennt sie eine Art „Emanationswirkung“ — auf die Gärtätigkeit gewöhnlicher Hefe aus, die um so stärker hervortritt, je höher die Temperatur bei der Vorbehandlung der Hefe war.

Der Zusatz toter Hefezellen bewirkt bis zu 50 Proz. höhere Gärgeschwindigkeit in Zucker- und Malz-Würzen und eine vermehrte Peptasewirkung ist festzustellen. Ferner tritt nach Zusatz der toten Hefezellen eine Entfärbung der Biere ein. Die Erscheinungen treten bei 15 bis 25° C energischer auf als bei Temperaturen zwischen 5 und 10°.

---

[1]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 345—347.

[2]) Wochenschr. f. Bauerei. Jahrg. 30. p. 363—367. Mit 1 Abbildung im Text und 20 Abbildungen auf einer Tafel in Kunstdruck.

[3]) Lindner, Mikroskop. Betriebskontrolle. 1. Aufl. 1895. p. 216—219; 5. Aufl. p. 282 u. 467; Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 17. p. 278; Jahrg. 22. p. 530; Jahrg. 23. p. 522.

[4]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 113—116.

Verf. ist der Ansicht, „daß das Wesen der Wirkung solcher toter Hefezellen auf eine gesteigerte Gärtätigkeit frischer Hefe zweifellos aufs engste mit der von Buchner, Meisenheimer, Euler, Young, Harden u. a. beobachteten Zymasewirkung zusammenhängt." Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Beobachtungen dieser Forscher und denen des Verf. liegt darin, daß es sich bei den Versuchen über Zymase um aus lebenden Zellen gewonnenen Hefepreßsaft, also um Lösungen, handelt, während die hier mitgeteilten Beobachtungen durch die einfache Gegenwart toter Hefezellen bewirkt wurden. Rommel (Berlin).

Bürger, O., Kann Ozon zu Desinfektionszwecken in der Brauerei verwendet werden?[1])

Verf. bestätigt frühere von Moufang mitgeteilte Versuchsergebnisse. Verf. teilt mit, daß — zum Teil im Gegensatz zu Untersuchungen von Will, Schönfeld und Hoffmann —,

1. es ohne Schwierigkeit gelingt, wässerige Ozonlösungen herzustellen, die schon in einer Konzentration von 15 mg Ozon im Liter energisch desinfizieren;

2. in vorgereinigten Versandfässern verbleibende Infektionskeime durch kurzes Behandeln mit genügend wirksamem Ozonwasser praktisch zerstört werden;

3. daß wässerige, genügend wirksame, Ozonlösungen auch vorgereinigte Filtermasse bei 5 Minuten dauernder Einwirkung zu sterilisieren vermögen.

Rommel (Berlin).

Frings, H., Essigbakterien-Dauerkulturen mittels des Fringsschen Dauerkultur-Kolbens[2]).

Die Aufbewahrung von Reinkulturen von Essigbakterien verursacht bei Anwendung der bisher meist üblichen festen Nährböden in den üblichen Kulturgefäßen viele Mühe; etwa in Zeitabständen von je drei Monaten ist ein Überimpfen nötig, um die Kulturen am Leben zu erhalten. Besser lassen sich flüssige Nährböden, zumal wenn man die Kulturen bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt, verwenden. Die Erwägung, daß lediglich die in den alkoholhaltigen Nährböden sich ansammelnde Essigsäure das Absterben der Bakterien herbeiführt und daß diese Essigsäure sich um so langsamer bilden muß, je kleiner die Sauerstoffzufuhr, d. h. die Flüssigkeits-Oberfläche ist, veranlaßte Verf., mit bestem Erfolg für den genannten Zweck Kolben zu verwenden, die bei 500 ccm Inhalt einen 15 cm langen und nur 20 mm weiten Hals besitzen. Der Kolben trägt als Hut ein in der Mitte eingeschnürtes Glasrohr, dessen obere Hälfte mit Watte gefüllt ist. Kolben und Hut passen ziemlich fest ineinander, ohne eingeschliffen zu sein.

Der Dauerkolben wird für sich sterilisiert, die alkoholische Nährlösung für die Essigbakterien wird am Rückflußkühler gekocht und nach dem Erkalten in den Kolben bis zur halben Höhe des Halses eingefüllt. Die Kolben werden nach dem Impfen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Unter diesen Verhältnissen ist die Säurezunahme eine so geringe, daß ein einmaliges Überimpfen im Zeitraum eines Jahres nach den Erfahrungen des Verf. vollkommen ausreicht.

Rommel (Berlin).

Pringsheim, H., Zur Totalhydrolyse des Hefeeiweiß[3]).

Bei der Selbstverdauung der Hefe, die eine Wirkung proteolytischer

---

[1]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 285—287.

[2]) Die deutsche Essigind. Jahrg. 17. p. 114—115.

[3]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 399—400.

Enzyme ist, werden Aminosäuren gebildet. Aus den Selbstverdauungsprodukten der Hefe hatte Salkowsky Tyrosin und Leuzin, Kutscher Guanin, Adenin, Histidin, Arginin, Lysin und Asparaginsäure isoliert. Verf. brachte die Fischersche Methode zur Trennung der Aminosäuren durch die Destillation ihrer Ester zum ersten Male auf das Hefeeiweiß zur Anwendung.

Bei den Versuchen wurden dreimal je 2 kg Preßhefe nach der Hydrolyse mit Salzsäure, oder in einem Falle Schwefelsäure, verestert und destilliert. Verf. zieht aus den Versuchsergebnissen folgende Schlüsse auf die Verteilung der als Ester destillierbaren Aminosäuren im Hefeeiweiß: Glykokoll und Alanin sind im Eiweiß der Hefezelle nicht, in geringen Mengen sind Prolin, Phenylalanin und Glutaminsäure, wahrscheinlich ist darin auch Serin enthalten. Die Hauptmenge der auf diese Weise erhaltenen Aminosäuren besteht aus Valin und Leuzin. Nun wissen wir durch F. Ehrlichs Untersuchungen, daß das Leuzin die Ursprungssubstanz des Amylalkohols im bei der alkoholischen Gärung sich stets bildenden Fuselöl ist und daß der Isobutylalkohol auf dieselbe Weise aus dem Valin hervorgeht. Der hohe Gehalt des Hefeeiweiß an Leuzin und Valin macht das regelmäßige Auftreten von Fuselöl bei der alkoholischen Gärung erklärlich. Nicht so sehr der Gehalt der Maischen an Fuselöl gebenden Aminosäuren ist für die regelmäßige Bildung des Fuselöls verantwortlich, als vielmehr die Tatsache, daß das Hefeeiweiß besonders reich an Valin und Leuzin ist. Rommel (Berlin).

Ehrlich, F., Über die Hydrolyse des Hefeeiweiß[1]).

Verf. weist unter Bezugnahme auf die obige Pringsheimsche Veröffentlichung darauf hin, daß er bereits in einer 1908 zusammen mit A. Wendel in der Biochem. Zeitschr. Bd. 8. p. 410—411 und 431—437 veröffentlichten Mitteilung über von ihm in der gleichen Richtung gemachte Versuche berichtete. Verf. und Wendel unterwarfen damals ebenfalls Preßhefe der Autolyse, dampften das Filtrat ein und veresterten nach Abscheidung der Hauptmenge des Tyrosins den Rückstand mit Hilfe der Fischerschen Methode. Bei der Destillation der erhaltenen Aminosäureester und Verseifung der einzelnen Fraktionen ergab sich, daß die Hauptmenge der Aminosäuren des Hefeeiweiß aus Leuzin, Isoleuzin und Valin bestand. Auch die Gegenwart von Prolin konnte damals festgestellt werden.

Rommel (Berlin).

---

[1]) Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg. 30. p. 000.

Inhalt.

Zusammenfassende Übersichten.

Riehm, E., Getreidekrankheiten und Getreideschädlinge, p. 81.

Referate.

Abderhalden, Emil, Schutzfermente des tierischen Organismus, p. 116.
— und **Fodor, Andor**, Versuche über die bei der Fäulnis von l-Asparaginsäure entstehenden Abbaustufen. Eine neue Methode zum Nachweis von β-Alanin, p. 112.
—, **Fromme, Georg**, und **Hirsch, Paul**, Die Bildung von γ-Aminobuttersäure aus d-Glutaminsäure unter dem Einfluß von Mikroorganismen, p. 112.
Allemann und **Müller**, Das Vorbrechen und das Scheiden der Käsereimolke, p. 146.
Anonyme, Note sur la préparation du Manioc amer (Manihot utilissima, Pohl) dans la région de Katalo-Kombe (Congo belge), p. 161.
—, Une Bactérie du filage, p. 129.
Arkwright, J, A., Natural Variation of B. acidi lactici with Respect to the Production of Gas from Carbohydrates, p. 142.
Audouard, L'impureté du sel alimentaire, p. 166.
Bainier, G., et **Sartory, A.**, Étude biologique et morphologique de certains Aspergillus, p. 114.

Bainier, G., et **Sartory, A.,** Étude de deux Penicillium nouveaux producteurs de pigment, p. 115.
— —, Étude d'un Penicillium nouveau, Penicillium Herquei n. sp., p. 115.
— —, Nouvelles recherches sur les Citromyces. — Étude de six Citromyces nouveaux, p. 165.
Bassalik, K., Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien, I. Mitteilung, p. 154.
Beijerinck, M., Über die Selbstgärung bei der Alkoholhefe, p. 124.
Bekaert, E., L'habitat du ferment de la tourne, p. 129.
Berg, Hugo, Über die Bazillen der Yoghurt-Milch, p. 143.
Bertin Sans et **Gaujoux,** Les catalases du lait de vache; leur signification au point de vue de la valeur hygiénique du lait, p. 141.
Bokorny, Th., Einwirkung von Eisen-, Mangan-, Zink- und Kadmiumvitriol auf die Vermehrung der Hefe, p. 121.
—, Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Gärkraft, p. 122.
Boullanger, E., et **Dugardin, M.,** Mécanisme de l'action fertilisante du soufre, p. 160.
Bradley, H. C., Lactase of the Mammary Gland, p. 120.
Bredemann, Untersuchungen über das Bakterienimpfpräparat „Heyls concentrated Nitrogen Producer“ (Composite Farmogerm), p. 157.
Broquin-Lacombe, A., Sur un pigment bleu du Bacillus mesentericus niger, p. 113.
Buchner, Eduard, und **Langheld, Kurt,** Notiz zur alkoholischen Gärung des Zuckers, p. 166.
Buchner, P., Studien an intrazellularen Symbionten. I. Die intrazellularen Symbionten der Hemipteren, p. 169.
Bürger, O., Kann Ozon zu Desinfektionszwecken in der Brauerei verwendet werden? p. 203.
International **Catalogue** of Scientific Literature, p. 110.
Chalot, C., Contribution à l'étude sur la fermentation du Cacao, p. 161.
Ciocalteu, L'épandage agricole et les Microbes, p. 156.
Collard Bovy, Comment doit être organisée l'inspection du lait spécialement dans les grandes villes, p. 131.
— et **Lust,** Dr. **E.,** Désidérata formulés pour la fourniture du lait aux gouttes de lait, aux consultations de puériculture, aux crèches, aux ponponnières et autres oeuvres de protection du premier âge, p. 131.
Czepa, Alois, Organismenleuchten und Zweckmäßigkeit, p. 112.
Densch, Zur Frage der schädlichen Wirkung zu starker Kalkgaben auf Hochmoor, p. 159.
Dox, W. Arthur, und **Ray, E. Neidig,** Enzymatische Spaltung von Hippursäure durch Schimmelpilze, p. 118.
Dreyer, G., Beiträge zur Chemie der Hefe. I. Über die Natur der Zellmembran. II. Untersuchungen über das Hefeneiweiß, p. 123.
Ehrlich, F., Über die Hydrolyse des Hefeeiweiß, p. 204.
Ernst, Wilhelm, Grundriß der Milchhygiene für Tierärzte, p. 137.
Euler, Hans, und **Cassel, Henry,** Über Katalysatoren der alkoholischen Gärung, p. 127.
— und **Johannsson, Daved,** Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme. VIII. Über die gleichzeitige Veränderung des Gehaltes an Invertase und an Gärungsenzymen in der lebenden Hefe, p. 117.
Freund, W., „Taette“, die Sauermilch der Skandinavier, p. 143.
Frings, H., Essigbakterien-Dauerkulturen mittels des Fringsschen Dauerkultur-Kolbens, p. 203.
Frost, G., Einiges über die Gewinnung und Behandlung roher Säuglingsmilch, p. 138.
—, Milchwirtschaftliche Tagesfragen, p. 137.
Fuhrmann, F., Vorlesungen über technische Mykologie, p. 107.
Gainey, P. L., The effect of toluol and CS_2 upon the microflora and fauna of the soil, p. 158.
Gerlach, M., Über die Wirkung einer Durchmischung des leichteren Bodens mit Moor, Mergel, Ton und Stroh, p. 153.
Goy, S., Über einige amerikanische Milchpulver, p. 135.
Greig-Smith, R., Contributions to our Knowledge of Soil-Fertility. No. 6. The Inactivity of Soil-Protozoa, p. 152.
Grüß, J., Biologie und Kapillaranalyse bei Enzymen, p. 116.
Guilliermond, A., Les Levures. Préface de E. Roux, p. 128.
Hanauer, Kommunale Milchversorgung, p. 138.
Herke, A., Impfversuche mit Knöllchenbakterien an Lupinen und Seradella, p. 156.
Hinze, G., Beiträge zur Kenntnis der farblosen Schwefelbakterien, p. 160
Hutchinson, C. M., Studies in bacteriological Analysis of Indian Soils, p. 154.
Jannin, L., et **Vernier, P.,** A propos des genres Zymonema et Mycoderma, p. 125.
Jensen, Orla, Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft, p. 139.
Jensen, Hj., et **Ott de Vries,** Onderzoekingen over tobak der Vorstenlanden, p. 169.
Issatschenko, B. L., Einige Daten über die Bakterien des „Eisbodens“ [Russisch], p. 151.
—, Über die Ablagerung von schwefeligem

Eisen in den Bakterien [Russisch], p. 113.
Keith, S. C., Factors influencing the Survival of Bacteria at Temperatures in the Vicinity of the freezing Point of Water. A preliminary Communication, p. 150.
Kendall, A. J., and **Farmer, Ch. J.,** Studies in Bacterial Metabolism, p. 111.
Klebahn, H., Grundzüge der allgemeinen Phytopathologie, p. 171.
Klose, Versuche betreffend die Herstellung von Kamembert-Käsen nach dem Mazéschen Verfahren, p. 147.
Knudson, Lewis, Tannic Acid Fermentation. I and II, p. 166.
Köck, G., Die wichtigsten Kartoffelkrankheiten und ihre Erkennung auf dem Felde, p. 172.
Kostytschew, S., Über Alkoholgärung. IV. Mitteilung. Über Zuckerspaltung durch Dauerhefe in Gegenwart von Zinkchlorid von S. Kostytschew und A. Scheloumoff p. 124.
— und **Hübbenet, E.,** Zur Frage der Reduktion von Acetaldehyd durch Hefesaft, p. 125.
—, — und **Scheloumoff, A.,** Über die Bildung von Acetaldehyd bei der anaëroben Atmung der Pappelblüten, p. 113.
Krüger, W., und **Wimmer, G.,** Gefäßversuche über die Wirkung verschiedener Stickstoffdünger bei Zuckerrüben, p. 155.
Kühl, H., Die Milchsäurelangstäbchen, p. 141.
—, Über eine Käsevergiftung, verursacht durch eine mit Bact. lactis aërogenes übereinstimmende Bakterie, p. 144.
Lane-Claypon, Janet E., The biological Properties of Milk, both of the human Species and of Cows, considered in special Relation to the Feeding of Infants, p. 138.
Lebedew, A. v., Über den Mechanismus der alkoholischen Gärung, p. 123.
—, 1. Über die Veresterung von Dioxyaceton mit Phosphaten. 2. Über Alkoholgärung, p. 121.
Lipman, Ch. B., The Distribution and Activities of Bacteria in Soils of the arid Region, p. 151.
Lubimenko et **Froloff-Bagreief,** Influence de la lumière sur la fermentation du mout de raisin, p. 149.
Lutz, L., Sur la présence dans le Gyromitra gigas et la Disciotis perlata de tyrosinase et d'un chromogène, p. 121.
Mayer, Gg., Die Anforderungen an Fleischbüchsenkonserven, p. 162.
Mayer, Paul, Zuckerfreie Gärung bei Stereoisomeren, p. 118.
McBeth, I. G., and **Scales, F. M.,** The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi, p. 167.
Meinert, C., Hygienisch einwandfreie Milch, p. 131.
Meyer, A., Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop, p. 110.
Mickel, H., Einiges über Leguminosenimpfung, p. 156.
Moreau, F., Sur les zones concentriques que forment dans les cultures les spores de Penicillium glaucum Lk., p. 116.
Moufang, E., Über eine katalytische Wirkung toter Hefezellen auf die Gärung, p. 202.
Mütterlein, C., Studien über die Zersetzung der Zellulose im Dünger und Boden, p. 167.
Náray, Andor, Ein neues Bacterium, das in der Milch einen gelben Farbstoff hervorbringt (Magyarisch), p. 140.
Nègre, L., Bactéries thermophiles des eaux de Figuig (Algérie), p. 149.
—, Bactéries thermophiles des sables du Sahara, p. 152.
Neuberg, Carl, Weitere Untersuchungen über die biochemische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure nebst Bemerkungen über die Entstehung der verschiedenen Milchsäuren in der Natur, p. 121.
— und **Rosenthal, P.,** Über zuckerfreie Hefegärungen. XI. Mitteilung. Weiteres zur Kenntnis der Karboxylase, p. 125.
Neville, Allen, Linseed Mucilage, p. 165.
Nicolae, O., Fermentierte Milch, p. 143.
Panzer, Theodor, Einwirkung von Ammoniakgas auf Diastase. III., p. 119.
—, Einwirkung von Ammoniakgas auf Invertase. IV. Mitteilung, p. 118.
—, Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas auf Diastase. V. Mitteilung, p. 119.
—, Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas auf Invertase.. VI. Mitteilung, p. 119.
—, Einwirkung von Stickoxyd auf Diastase. VII. Mitteilung, p. 119.
—, Einwirkung von Stickoxyd auf Invertase. VIII. Mitteilung, p. 119.
Paraschtschuk, S., Biologische Untersuchungsmethode für die Güte der Milch, p. 132.
Percival, J., and **Mason, G. H.,** The Microflora of Stilton Cheese, p. 145.
Pringsheim, H., Zur Totalhydrolyse des Hefeeiweiß, p. 203.
Reed, H., Die enzymatische Kraft gewisser Pflanzendiastasen, p. 120.
Richet, Ch., Une race de ferment lactique arsénicophile (accoutumée aux fortes doses d'arsenic), p. 120.
Rieckhoff, P., Einiges über die Gewinnung und Behandlung roher Säuglingsmilch, p. 132.
Ritter, Über die lediglich chemische Ursache sowie das nähere Wesen der schädigenden Wirkung starker Kalkungen auf Hochmoorboden, p. 158.

Roger, H., Influence de la bile sur les fermentations microbiennes. I. Fermentation de l'amidon. II. Fermentation du glycogène. III. Fermentation du glucose, p. 118.

Rogers, L. A., and **Davis, Brooke J.,** Methods of classifying the lactic-acid bacteria, p. 141.

—, **Berg, W. N., Potteiger, C. R.** and **Davis, B. J.,** Factors influencing the Change in Flavor in storage Butter, p. 149.

Rosam, A., Eine einfache mikroskopische Beurteilung des Gehalts der Milch an Mikroorganismen, p. 140.

—, Eine einfache Methode zur Beurteilung des Gärungsvermögens verschiedener Futterstoffe, der Milch und des Galaktaseenzyms der Milch, p. 163.

Rosenau, M. J., The Milk Question, p. 132.

Rossi, G. e **Ciaccia, M.,** Novo contributo allo studio della decomposizione dei vegetali, p. 161.

—, —, Studii critici e sperimentali sui fermenti pectici anaerobici, p. 161.

Rubner, Max, Über die Nahrungsaufnahme bei der Hefezelle, p. 128.

Sani, G., Azione del fosfato monocalcico sulla conservazione dei foraggi verdi, p. 163.

Sartory, A., Sur la présence d'Aspergillus fumigatus Fresenius sur des cigares, p. 169.

— et **Sydow, H.,** Etude biologique et morphologique d'un Aspergillus nouveau, A. Sartoryi Syd. n. sp., p. 114.

Sauton, R., Sur la sporulation de l'Aspergillus fumigatus, p. 114.

Sawamura, S., On Bacillus Natto, p. 114.

Schiemann, E., Mutation bei Aspergillus niger van Tieghem, p. 114.

Schmid, Die westpreußische Käserei im Frühjahr, p. 147.

—, Lab und Sauer in der Schweizerkäserei, p. 148.

Schneider, E., Schimmelpilze in Leinkuchen, p. 164.

Shibata, K., Untersuchungen über lockere Bindung von Sauerstoff in gewissen farbstoffbildenden Bakterien und Pilzen, p. 111.

Simon, Was ist bei Ausführung einer Hülsenfrucht-Impfung besonders zu beachten? p. 156.

Söhngen, N. L., Einfluß einiger Kolloide auf die Alkoholgärung, p. 125.

Sprinkmeyer, Fr., Versuche über die Einwirkung von Saugflaschen mit Rohr auf den Keimgehalt der daraus abgesaugten Milch, p. 135.

Steng, H., Die Milch brünstiger Kühe, p. 133.

Stowell, E. C., Hilliard, C. M. and **Schlesinger, M. J.,** A statistical Study of the Streptococci from Milk and from the human Throat, p. 133.

Teichert, K., Über bankrote Käse, p. 147.

Ursprung, A., Über das exzentrische Dickenwachstum an Wurzelkrümmungen und über die Erklärungsversuche des exzentrischen Dickenwachstums, p. 172.

Van de Velde, H., L'approvisionnement de lait à New-York, p. 135.

Vandevelde, A. J. J. und **Vanderstricht, A.,** Über Invertasereaktion bei gemischten Hefekulturen, p. 129.

Vouk, V., Die Lebensgemeinschaften der Bakterien mit einigen höheren und niederen Pflanzen, p. 111.

Wehmer, C., Pilzverzuckerung und Amyloverfahren, p. 164.

—, Über Variabilität und Spezies-Bestimmung, p. 115.

—, Über Zitronensäuregärung, p. 164.

Weyland, H., Zur Ernährungsphysiologie mykotropher Pflanzen, p. 170.

Wiegert, E., Zur Bereitung und Anwendung von Yoghurtmilch, p. 143.

Will, H., Beobachtungen an den Kristallen in Bierhefen und in Faßgelägern, p. 126.

—, Einfluß der Konzentration der Würze auf die Entwicklung von Organismen bei der biologischen Untersuchung von Brauwasser, p. 130.

Zikes, H., Über den Einfluß von Aluminium auf Hefe und Bier, p. 122.

Zwick und **Krage,** Über die Ausscheidung von Abortusbazillen mit der Milch infizierter Tiere, p. 136.

Untersuchungsmethoden, Instrumente etc.

Beauverie, J., Les méthodes de la biométrique appliquées à l'études des levures, p. 175.

Devarda und **Weich,** Die Morressche „Alizarolprobe" zur Prüfung der Haltbarkeit der Milch, p. 183.

Euler, Hans und **Johannsson, David,** Über die Reaktionsphasen der alkoholischen Gärung, p. 175.

Frick, Joseph, Untersuchungen über den Einfluß der Leukocytenzahl und der Entzündungsprodukte auf die Reaktion der Milch, p. 180.

Fromme, Bakteriologische Trinkwasseruntersuchungen und Colibazillen, p. 175.

Frouin, A., Le milieu de culture d'acides aminés complets pour microorganismes, p. 174

Henningson, B., Eine neue Methode zur Beurteilung der fäkalen Verunreinigung eines Wassers, gegründet auf die Veränderlichkeit des Gasbildungsvermögens von B. coli, p. 177.

König, J., Hasenbäumer, J. und **Glenk, K.,** Über die Anwendung der Dialyse und die Bestimmung der Oxydationskraft für die Beurteilung des Bodens, p. 184.

Küster, Ernst, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen für den Gebrauch in zoologischen, botanischen, medizinischen und landwirtschaftlichen Laboratorien, p. 174.

Metzger, Karl, Untersuchungen über die Alkoholprobe bei Milch von kranken Kühen, p. 181.

Pallmann, Karl, Die Milch-Labhemmprobe, p. 181.

Rochaix, A., Nouveau milieu végétal pour cultures microbiennes (Agar au jus de carotte), p. 174.

Rullmann, W., Vorläufige Mitteilung über Römers Arbeit: „Zur Schardinger-Reaktion der Kuhmilch, p. 180.

Scheel, Hartwig, Eignet sich die Schardinger-Reaktion zur Feststellung des Frischmilchendseins der Kühe? p. 180.

Sommerfeldt, Sigurd, Beitrag zur Bestimmung des Keimgehaltes in der Milch, p. 182.

Das neue **Steroverfahren** zur Veredelung von Milch und Milcherzeugnissen, p. 179.

Ulmann, Hermann, Untersuchungen von Milch euterkranker Kühe auf ihren Enzymgehalt, p. 182.

Vollrath, Carl, Untersuchungen über den Einfluß äußerer und innerer Krankheiten auf den Enzymgehalt der Kuhmilch, p. 183.

Whipple, George H., The 37° Bacterial Count, p. 174.

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien.

Anonym, Milcherhitzung und Kannendämpfung, p. 194.

Backhaus, Über Kindermilchbereitung nach 20-jähriger Erfahrung, p. 195.

Böeseken, J., et **Waterman, H.,** Sur l'action de quelques dérivés du benzène sur le développement de Penicillium glaucum, p. 187.

Clement, H., Action de l'argent sur la végétation de l'Aspergillus niger, p. 187.

Codur, J. et **Thiry, G.,** Aspergillus et argent métallique, p. 186.

Das Kristall-Milchfilter, p. 194.

Denkschrift des Deutschen Milchwirtschaftlichen Vereins über die Errichtung einer wissenschaftlichen Anstalt für die deutsche Milchwirtschaft, p. 195.

Eichloff und **Beer,** Milchkonservierungsmittel „Doux", p. 196.

Kennerknechts abnehmbarer **Flaschenverschluß,** p. 194.

Hairi, Ekrem, Über den Einfluß der organischen Substanzen auf die Desinfektion des Trinkwassers mit Chlor, p. 192.

Hering, F., Über hygienisch einwandsfreie Milchaufbereitung, p. 196.

Hesselink van Suchtelen, Methode zur Gewinnung der natürlichen Bodenlösung, p. 198.

Javillier, Influence du zinc sur la consommation par l'Aspergillus niger des aliments hydrocarbonés, azotés et minéraux, p. 186.

Kiesel, Sur l'action de divers sels acides sur le développement de l'Aspergillus niger, p. 186

Kühl, H., Untersuchungen über die Konservierung der Butter (speziell für Tropenversand), p. 196.

Laifle, X., Zur Theorie und Praxis der Formaldehyd-Vakuum-Desinfektion, p. 198.

Lasseur, Ph., Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses Bactéries, p. 188.

Lauterborn, Robert, Die biologische Selbstreinigung unserer Gewässer, p. 188.

Lobeck, O., Neues Verfahren zum Entkeimen von Milch, p. 195.

Lyon, T. Lyttleton, and **Bizzell, James A.,** Water-soluble matter in soils sterilized and reinoculated, p. 198.

Morse, John Lovett, Sterilization, Boilling and Pasteurization of Milk, p. 193.

Oker-Blom, M., Über die Wirkungsart des ultravioletten Lichtes auf Bakterien, p. 185.

—, Über die keimtötende Wirkung des ultravioletten Lichtes in klarem, getrübtem und gefärbtem Wasser, p. 189.

Thiersch, Über die verschiedenen Verfahren zur Reinigung von Abwässern, p. 193.

Wehmer, C., Selbstvergiftung in Penicilliumkulturen als Folge der Stickstoffernährung, p. 186.

Weinzirl, John and **Thomas, J. Bosley,** A Comparison between the Sand Filtration Method and the Bubbling Method for Enumerating Bacteria in the Air, p. 188.

Originalreferate aus bakteriologischen und gärungsphysiologischen etc. Instituten, Laboratorien etc.

Lindner, P., und **Genoud, E. G.,** Zur Charakteristik der Willia belgica und einiger Hefen aus belgischem Lambicbier, p. 202.

— und **Grouven, O.,** Inwieweit findet eine Beeinflussung der Desinfektionswirkung verschiedener Antiseptika durch gesteigerte Hefemengen statt? p. 200.

— und **Schmidt, O.,** Die Widerstandsfähigkeit eines bei verschiedenen Temperaturen herangezüchteten Hefenmaterials gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln und der Einfluß der Temperatur während der Einwirkung der letzteren, p. 201.

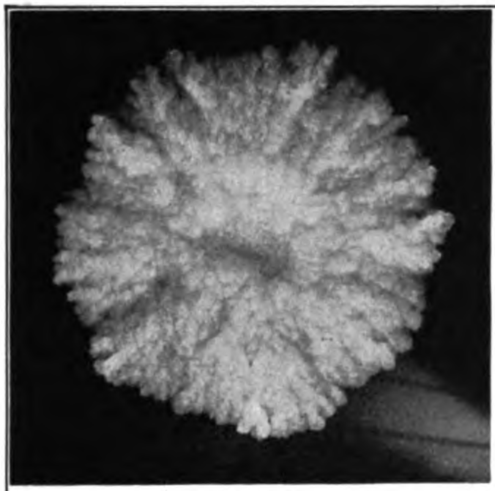
Nagel, C., Furfurol, seine Entstehung, sein Verbleib und Nachweis, besonders in bezug auf den Brauereibetrieb, p. 202.

Schönfeld, F., und **Hoffmann, K.,** Ozon als Desinfektionsmittel in der Brauerei, p. 201.

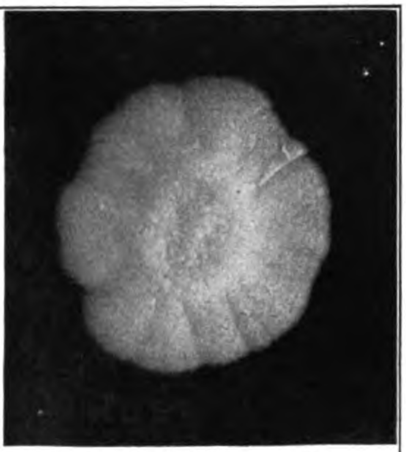
Abgeschlossen am 20. September 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

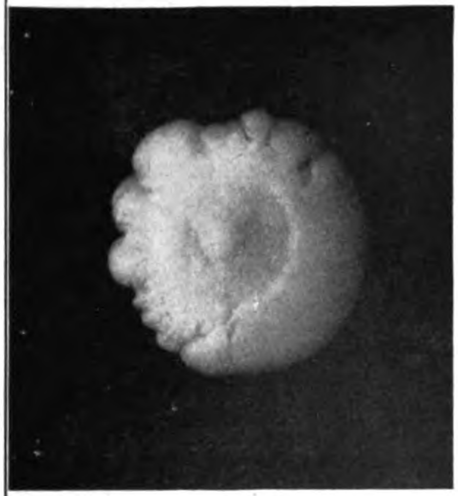
Centralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. 39. ***Edwards,*** *Cheddar Cheese. Plate II.*



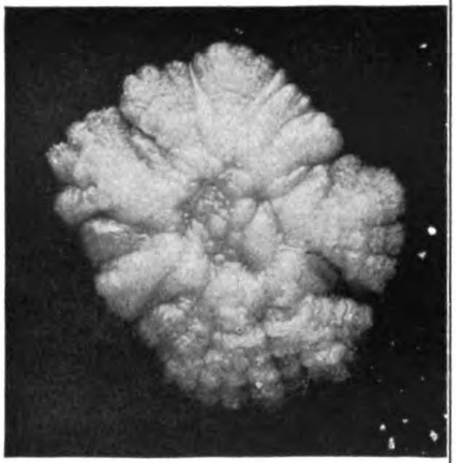
A.2.



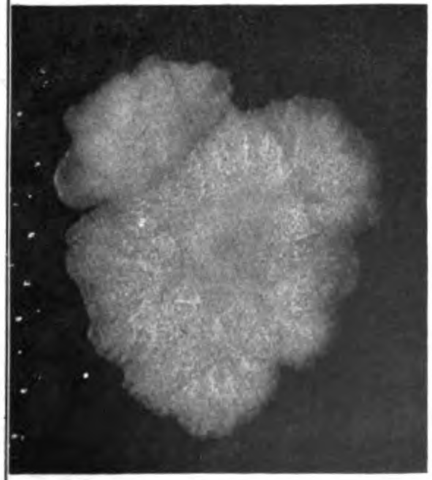
A.5.



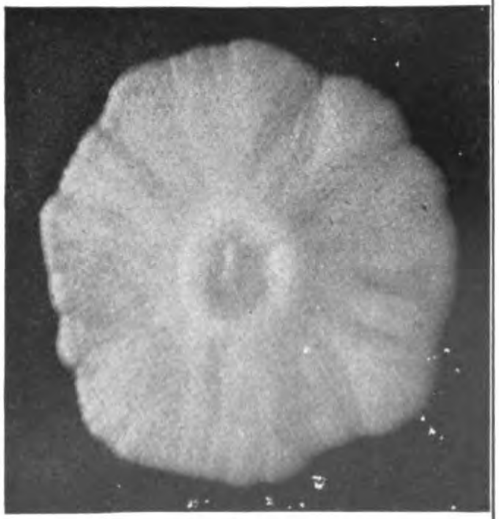
B.2.



B.4.



D.1.



J.1.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 8|14.

Ausgegeben am 18. November 1913.

Nachdruck verboten.

Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien mit besonderer Berücksichtigung der speziesdiagnostisch verwertbaren Merkmale und des Vermögens der Harnstoffspaltung.

Von Dr. **Arno Viehoever,**

vorm. Assistent am Botanischen Institut der Universität Marburg.

Mit 2 Tafeln und 22 Textfiguren.

Einleitung.

Zusammenstellung der wichtigsten Resultate.

Vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1909—1913 unter Leitung von Herrn Professor Meyer im Botanischen Institut zu Marburg ausgeführt.

Es war ihre allgemeine Aufgabe, die Morphologie und Physiologie der harnstoffspaltenden sporenbildenden Spezies der Gattung Bacillus zu fördern. Sie sollte zuerst den Fehler vieler ähnlicher Arbeiten vermeiden, bei den physiologischen Untersuchungen unbestimmbare, also nicht mehr wiederzufindende Bakterien als Versuchsobjekte zu benutzen. Arbeiten, die mit solchem, nicht sicher wieder aufzufindendem Material gemacht wurden, haben stets nur einen zweifelhaften Wert, denn sie sind nicht kontrollierbar und es ist meist kein sicheres Weiterbauen auf den mit ihnen gewonnenen Resultaten möglich.

Die Arbeit sollte ferner ganz allgemein eine exakte systematische Kenntnis der harnstoffspaltenden Spezies begründen helfen. Der Vorgang der Harnstoffspaltung sollte genauer untersucht werden, vorzüglich sollte auch die Frage beantwortet werden, ob die Energie der Harnstoffspaltung von der Einheit des Protoplasten der betreffenden Spezies abhängig und durch äußere Faktoren beeinflußbar sei.

Von den Resultaten der Arbeit mögen die folgenden kurz hervorgehoben werden:

Die mir durch die Freundlichkeit der Herren Professoren Beijerinck, Löhnis und Král zugänglich gemachten Stämme:

1. Urobacillus pasteurii Miquel, Originalstamm Beijerinck;
2. Urobacillus leubei Beijerinck, Originalstamm Beijerinck, von Král bezogen;
3. Bacillus Pasteuri (Miquel) Migula, Originalstamm B_2 Löhnis

erwiesen sich als identisch mit der von mir isolierten und von uns jetzt Bacillus probatus A. M. et Viehoever genannten Spezies.

Etwas abweichend von unserer Spezies verhielt sich die mir von Herrn Professor Löhnis freundlicherweise übermittelte Kultur der Spezies:

Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula, Originalstamm I Löhnis, die deshalb als besondere Spezies betrachtet werden soll, möglicherweise aber doch noch zu unserer Spezies gehört.

Zu unserer Spezies Bacillus probatus gehören wahrscheinlich die folgenden, nicht mehr in Originalkulturen zu erhaltenden Formen, welche wenigstens eine Anzahl von diagnostischen, für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechenden Merkmalen, dagegen kein wesentlich davon abweichendes Merkmal besitzen. Die Spezies sind nicht genügend genau beschrieben und deshalb zu streichen:

1. Bacillus ureae α = Urobacillus Madoxii Miquel.
2. „ „ γ = „ Freudenreichii Miquel.
3. „ „ β = „ Duclauxii Miquel.
4. „ „ ϱ = „ Pasteurii Miquel.
5. „ „ δ = „ δ Miquel.
6. „ „ ε = „ ε Miquel.
7. „ „ Stamm II Burri.
8. „ „ „ III „
9. Bacterium ureae = Bacillus ureae (Leube) Günther.
10. Die sporenbildenden Harnstoff-spaltenden Bakterien von Rochaix et Dufourt.

Die Spezies Bacillus probatus A. M. et Viehoever zeigte unter anderem die nachfolgenden Eigenschaften:

Harnstoffspaltungsvermögen: Gehen wir von 10 Millionen Sporen der verschiedenen Stämme unserer Spezies aus, als Impfmaterial in 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff und lassen wir die Kulturen 20—50 Stunden bei 28° stehen, so ist die Größe der Harnstoffspaltung annähernd proportional der gefundenen Oidienzahl (der Zählung der Oidien wurde möglichst die durchschnittliche Sporangiengröße zugrunde gelegt):

Stäbchenzahl in Millionen	Gespaltene Harnstoffmenge in g
2076	0,0
2877	0,075
3165	0,084
3618	0,144
3782	0,168
4586	0,327

Die Vermehrungs- und Spaltungsgröße in 2-proz. Harnstoffbouillon ist also folgende:

Bei rund 2100 Millionen Stäbchen sind gespalten rund 0%
„ „ 2900 „ „ „ „ „ 19%
„ „ 3200 „ „ „ „ „ 21%
„ „ 3600 „ „ „ „ „ 36%
„ „ 3800 „ „ „ „ „ 42%
„ „ 4600 „ „ „ „ „ 82%

des zugesetzten Harnstoffs.

Daraus geht hervor, daß die Harnstoffspaltung erst nachweisbar wird, wenn mehr als 2000 Millionen Stäbchen gebildet sind. Nehmen wir an, daß bei 2500 Stäbchen eben Ammoniak nachzuweisen ist, so finden wir für weitere je 500 Millionen Stäbchen etwa 20 Proz. Harnstoff zersetzt: bei 3000 = 20 Proz., bei 3500 = 40 Proz., bei 4500 = 80 Proz. des zugesetzten Harnstoffs. Das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltungsgröße konnte weder durch längere Fortzüchtung auf harnstoffreiem oder harnstoffhaltigem Nährboden, noch bei Durchführung der Spaltung in verschiedenen Nährböden beträchtlich verschoben werden. Auch vorbehandelnde Züchtung bei der für die Sporenbildung maximalen Temperatur oder die Vornahme der Gärung bei dieser Temperatur konnten das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltungsgröße nicht merklich verändern.

Alle Verminderungen oder Vermehrungen der Ammoniakproduktion aus

Harnstoff ließen sich auf die verschieden große Schnelligkeit der Oidienvermehrung zurückführen.

Auch die folgenden Beobachtungen, welche die Spezies als wahrscheinlich autotroph erscheinen lassen, sind von Wichtigkeit: Die Spezies kann zu den Nitritbakterien gerechnet werden, denn sie vermag Ammoniak in Nitrit zu verwandeln. Die Spezies kann anscheinend (siehe die diesbezüglichen Versuche mit meinem Originalstamm) in stickstoffreier mineralischer Nährlösung noch wachsen, wenn diese als Stickstoffquelle nur Ammoniumkarbonat enthält, und demnach ihren Kohlenstoffbedarf zur Not aus dem Ammonkarbonat decken. Die Spezies wächst sicher kräftiger als autotroph mit Ammoniak und Asparagin und noch viel besser mit Ammoniak und Pepton saprophytisch, kann jedoch in mineralischer M-Nährlösung nicht wachsen, wenn diese nur unzersetzten Harnstoff enthält oder die Stoffe: Glykokoll, Leuzin, Azetamid, Oxamid, Succinimid, Harnsäure, Urethan, Kreatin, Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff.

Besondere Aufmerksamkeit wurde auch der Frage zugewandt, ob es möglich sei, den dauernden Verlust des Sporenbildungsvermögens bei Erhaltung der vegetativen Entwicklungsmöglichkeit herbeizuführen. Zu diesem Zwecke züchtete ich das Bakterienmaterial meines Originalstammes lange Zeit auf künstlichen Nährböden, impfte es dabei in verschieden langen Abständen über, immer ohne es vorher abzukochen; die Kulturen wurden bei günstigen und ungünstigen, z. T. maximalen Temperaturen gehalten. In anderen Versuchen wurden dem Nährboden Gifte, Soda, Ammonkarbonat oder Harnstoff in verschieden großen Mengen zugesetzt. Es gelang jedoch in keinem Falle, den dauernden Verlust des Sporenbildungsvermögens herbeizuführen: entweder trat eine so starke allgemeine Schwächung ein, daß auch das Entwicklungsvermögen dauernd aufgehoben wurde oder es gelang nachträglich, durch Züchtung bei optimalen Bedingungen wieder Sporen zu erhalten.

Interessant ist auch das Ergebnis, daß bei häufiger Überimpfung nicht abgekochten Materials unter Berücksichtigung der optimalen Kulturbedingungen eine allgemeine Stärkung der Stämme eintrat. Das Tuscheverfahren von Burri zur Isolierung von Einzelzellen wurde vereinfacht, da eingehende Versuche keine bemerkenswerte Schädlichkeit der Pelikantusche (Günther Wagner, Hannover) für Bakterien ergaben.

Schließlich erwähne ich noch kurz die Versuche, welche ich über die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Gifte (Zinksulfat und Kaliumdichromat) und gegen Säuren (Salzsäure und Schwefelsäure) gemacht habe. Ich benutzte dabei folgende einfache Methode, bei der eine Wachstumshemmung, durch etwa im Sporenmateriale zurückgebliebene Gift- oder Säurereste hervorgerufen, kaum in Betracht kam, wenn dieses sorgfältig genug ausgewaschen war: Das ausgereifte Sporenmaterial wurde in Spitzgläschen mit bestimmten Mengen der Säure oder der Giftlösung bekannter Konzentrationen zusammengebracht, zur gleichmäßigen Verteilung öfters geschüttelt und die Mischung nach bestimmten Zeitabständen bis zur völligen Klärung zentrifugiert. Nach Entfernung der Giftlösung wurde der Sporenrest mehrere Male unter Zuhilfenahme der Zentrifuge mit sterilem Wasser ausgewaschen, bis auf chemischem Wege nichts mehr von den Zusätzen nachweisbar war, eine Öse des Sporenmaterials dann in optimale Kulturbedingungen übertragen und auf dem Nährboden schließlich der Eintritt der Sporenkeimung oder des sichtbaren Wachstums verfolgt.

Es stellte sich dabei heraus, daß die Sporen getötet waren, als sie 106

Minuten mit 16 Proz. Schwefelsäure und 40 Minuten mit 25proz. Salzsäure bei 28° in Berührung waren; dagegen blieben die Sporen noch entwicklungsfähig nach einer Einwirkung von 16 Proz. Schwefelsäure während 50 Minuten bei 28°, von 16 Proz. Salzsäure während 10 Minuten bei 28°, von nahezu 30-proz. Zinksulfatlösung während 8 Stunden bei 28° und während 3 Wochen bei ca. 17°, von nahezu 15-proz. Kaliumdichromatlösung während 8 Tagen bei 28° C.

Den Herren Professor Beijerinck-Delft, Dr. Christensen-Kopenhagen, Professor Ficker-Berlin, Dr. Söhngen-Middelburg und besonders Herrn Professor Löhnis-Leipzig möchte ich für die Überlassung von Originalkulturen, den Herren Professor Kutscher-, Dr. Berlin- und Dr. Engeland-Marburg für die freundliche Unterstützung bei tierphysiologischen Versuchen auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen. Für briefliche Auskunft bin ich den Herren Professoren Burri in Bern-Liebefeld, Leube-Würzburg, Dr. Liebert-Helden und Professor Miquel-Paris zu Dank verpflichtet.

Kapitel 1.

Geschichte, Vorkommen, Gewinnung, Vorkultur und Weiterzucht, Abhängigkeit des Sporenbildungsvermögens von äußeren Faktoren.

Geschichtliches.

Es ist eine allbekannte Erscheinung, daß Menschen- oder Tierharn bei längerem Stehen an der Luft trübe wird, und daß diese trübe Flüssigkeit bald einen unangenehm starken Geruch nach Ammoniak entwickelt.

Die Ursache dieser eigentümlichen Veränderung des Harnes blieb jedoch bis vor rund 50 Jahren trotz jahrhunderterlanger Forschung unaufgeklärt. Wohl war es gelungen, den Harnstoff aus dem Harne zu gewinnen und rein darzustellen; auch den Zerfall des Harnstoffes in Ammoniak und Kohlensäure bei der Harnfäulnis hatte man erkannt. Man wußte jedoch damit noch nichts über die Entstehung der ammoniakalischen Harngärung, nichts über die Ursache des Harnstoffzerfalls. Hierüber schafften erst die Arbeiten Pasteurs Klarheit.

Pasteur machte im Jahre 1860 (p. 849) darauf aufmerksam, daß gekochter Harn in zugeschmolzenen Röhren unzersetzt blieb, durch Luftstaub aber unter Ammoniakentwicklung zersetzt wurde; in der Flüssigkeit fand er Bakterien, Pilze und Infusorien. 2 Jahre darauf (1862, p. 50—57) beschrieb dieser Forscher dann als Erreger der Harngärung ein kugeliges Lebewesen, das er Torule ammoniacale nannte. Van Tieghem kam etwas später (1864, 1. u. 2., p. 210—264) bei dem Studium der Gärung des Harnes und künstlicher Harnstofflösungen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß vorwiegend „Kokken" zur Harnstoffspaltung befähigt seien.

Miquel (s. Literaturverzeichnis) beschäftigte sich vom Jahre 1878 an bis zum Jahre 1898 eingehend mit den Erregern des Harnstoffabbaues; er wies in zahlreichen Einzelarbeiten und zusammenfassend 1898 in seinem Buche „Étude de la fermentation ammoniacale", 1904 in Lafars Handbuch der technischen Mykologie (Bd. 3, p. 71ff.) darauf hin, daß außer kokkenförmigen auch eine große Anzahl stäbchenförmiger Bakterien, ja selbst Fadenpilze die Fähigkeit haben, den Harnstoff zu zerlegen. Diese Eigenschaft hatten auch stäbchenförmige Bakterien, die Leube (1885, p. 558—562) in Gemeinschaft mit Graser aus Harn isolierte und beschrieb.

Burri, Herfeldt und Stutzer (1895, p. 329) züchteten aus Torfmull drei, ihrer Angabe nach, verschiedene Bakterienarten mit gleicher Fähigkeit. Beijerinck erweiterte dann 1901 (p. 33 ff.) unsere Kenntnis der harnstoffspaltenden Bakterien durch Isolierung einiger bis dahin unbekannter, durch genauere Beschreibung schon bekannter Formen; er wies außerdem auf die leichte Isolierungsmöglichkeit dieser Organismen durch Anwendung der „Anhäufungsmethode" hin. Löhnis (1905, p. 719; 1908, p. 684) isolierte aus Dünger eine große Anzahl von Stämmen zum Teil, seiner Angabe nach, schon bekannter sporenbildender, wie nicht sporenbildender Arten und beschrieb sie ausführlicher.

Söhngen (1909, p. 91) untersuchte die Harnstoffspaltung bei Abwesenheit von Eiweiß und entdeckte zwei unter diesen Verhältnissen arbeitende, nicht sporenbildende Formen.

Christensen (1910, p. 336) verfolgte den Einfluß der Humusstoffe auf die Harnstoffspaltung. Er entdeckte einige Formen, die die Fähigkeit besaßen, Humusstoffe auszunutzen; außerdem züchtete Christensen einen kleinen, nicht sporenbildenden Organismus, der mit Harnstoff als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle auskommen konnte.

Rochaix und Dufourt (1910, p. 312; 1911, p. 205—207) haben aus Pferdemist mehrere harnstoffspaltende, kokken-und stäbchenförmige Bakterien isoliert, bei der Beschreibung jedoch fast nur biochemische Eigenschaften berücksichtigt. Auch Liebert isolierte aus Gartenerde einen nichtsporenbildenden Bazillus mit schwach harnstoffspaltender Wirkung (s. Liebert 1909, p. 61).

Der Vollständigkeit halber erwähne ich, daß sich außer den genannten Forschern auch Cohn (1872), Cazeneuve und Livon (1877), von Jaksch (1881), Warington (1888), Burchard (1899), Rovsing (nach Migula, 1900), Mann (nach Lehmann und Neumann, 1907 und 1912) und andere (siehe Kap. 11) mit dem Studium der ammoniakalischen Harn- oder Harnstoffzersetzung durch Bakterien beschäftigt haben.

Vorkommen und Verbreitung der harnstoffspaltenden Bakterien.

Bakterien mit Harnstoffspaltungsvermögen finden sich überall in der Natur vor: Nach den Untersuchungen der genannten Forscher, besonders denjenigen von Miquel (1904, p. 74) sind sie in Luft, Fluß, Kanal- und Abwässern, sowie auch in Erde anzutreffen. Kellner (1886) fand Harnstoffbakterien im Erdboden bis zu 1,20 m Tiefe; ihre lebhafteste Tätigkeit entfalteten sie allerdings nur 5 cm unterhalb der Erdoberfläche.

Gewinnung und Reinzucht.

Miquel (1904, p. 73) empfiehlt zur Gewinnung der Harnstoffbakterien die Keime des zu untersuchenden Materiales auf 2—5-proz. harnstoff- und peptonhaltigen Gelatineplatten zu züchten: die Kolonien harnstoffspaltender Bakterien umgeben sich dann mit einem weißen pulverförmigen Kranz von Calciumkarbonat und Calciumphosphatkristallen, die durch das im Nährboden entstehende Ammoniak ausgefällt werden.

Einfacher ist das Beijerinck sche Anhäufungsverfahren (Beijerinck 1901): Man bringt das keimverdächtige Material, z. B. Erde, in 5- oder 10-proz. Harnstoffbouillon; nur die harnstoffspaltenden Organismen kommen zu einer kräftigen Entwicklung und bleiben schließlich allein in den Kulturen übrig, aus denen sie dann in Nährmedien mit geringerem Harnstoffgehalt übertragen werden. Sporenbildende Harnstoffspalter werden durch Pasteurisieren des Ausgangsmaterials, Kokken und Sarzinen durch Kultivierung bei niederen Temperaturgraden angehäuft.

Zur Reinzucht und weiteren Kultivierung wurden in den meisten Fällen Nährböden mit 2 Proz. Harnstoff benutzt.

Fangen und Reinzüchtung des Bac. probatus (Originalstamm).

Aus dem botanischen Garten zu Marburg a. L. wurde etwas Erde etwa 30 cm tief dem Boden entnommen, und eine kleine Menge davon nach kurzem Erhitzen bei 100° C mit stickstoffreier M-Nährlösung (siehe p. 6) angesetzt, die noch 2 Proz. Harnstoff und 0,5 Proz. Fleischextrakt enthielt. Nach dreiwöchiger Kultur bei 28° C entnahm ich der stark getrübten Flüssigkeit, die vorwiegend etwa 1 μ große Sporen und bis etwa 10 μ lange Stäbchen enthielt, eine geringe Menge, kochte sie 1 Minute bei 100° C ab und züchtete den sporenbildenden Bacillus nach der Koch schen Verdünnungsmethode rein. Als Kulturboden verwendete ich, da sich D-Agar als ungeeignet erwies, zuerst Harnstoffmineralagar, d. h. einen Agar, der die Nährstoffkonzentration oben genannter Nährlösung hatte (s. p. 214).

Auswahl des Nährbodens.

Die Versuche wurden angestellt, um einen Nährboden zu finden, auf dem sowohl das Wachstum, als auch die Sporenbildung gut und gleichmäßig vor sich ging.

Zu diesem Zwecke wurden folgende Nährböden hergestellt:

1. D-Agar neutral = Nähragar mit Dextrose (Pepton Witte 6,0, Fleischextrakt Liebig 4,0, Kochsalz 1,0, Dextrose 5,0, Agar-Agar 10,0, Wasser 500,0).
2. D-Agar neutral + 0,25 % Natriumkarbonat.
3. „ „ + 1,0 % Calciumkarbonat.
4. „ „ + 2 % Harnstoff + 0,3 % Ammoniumkarbonat.
5. Nähragar neutral (ohne Dextrose) + 0,25 % Natriumkarbonat.
6. „ „ + 3 % Harnstoff + 0,3 % Ammoniumkarbonat.
7. $\frac{1}{3}$ D-Agar (= Agar mit $\frac{1}{3}$ Nährstoffkonzentration) + 0,1 % Na_2CO_3.
8. $^1/_5$ „ „ „ $^1/_5$ „ + 0,1 % „
9. $^1/_{10}$ „ „ $^1/_{10}$ „ + 0,1 % „
10. $\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,05 % Natriumkarbonat.
11. $\frac{1}{3}$ „ + 0,25 % „
12. $\frac{1}{3}$ „ + 1,0 % „
13. $\frac{1}{3}$ „ + 2 % Harnstoft + 0,1 % Natriumkarbonat.
14. $\frac{1}{3}$ „ + 0,2 % „ + 0,1 % „
15. $\frac{1}{3}$ „ + 0,2 % Ammoniumkarbonat + 0,1 % Natriumkarbonat.
16. Harnstoff-Mineral-Agar:
    2 % Harnstoff, 0,5 % Fleischextrakt Liebig, 100,0 M-Nährlösung (K_2HPO_4 0,1, $CaCl_2$ 0,01, $MgSO_4$ 0,03, NaCl 0,01, FeCl 0,001, H_2O 100,0).

Versuchsanordnung: Die Nährböden wurden zu etwa je 5 ccm in Reagensgläser gefüllt und sterilisiert. Als Impfmaterial fanden ausgereifte Sporen und junge Stäbchen von auf Harnstoffmineralagar gewachsenen Kulturen Verwendung. Die Kulturen wurden bei 28° gezüchtet.

Resultat der Kulturversuche:

Entwicklung	Sporenbildung	Nährboden
keine	keine	auf D-Agar lackmus neutral
schwache, unsichere	ganz vereinzelt	„ „ + 0,25 % Na_2CO_3
„ „	„ „	„ „ + 1 % $CaCO_3$
„ „	„ „	„ Nähragar + 0,25 % Na_2CO_3
„ „	„ „	„ $\frac{1}{3}$ D-Agar + 1 % Na_2CO_3
„ „	„ „	„ D-Agar + 2 % Harnstoff + 0,3 % Ammonkarbonat.
deutliche	deutliche	„ $\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,1 % Na_2CO_3
„	„	„ $^1/_5$ „ + 0,1 % „
„	„	„ $^1/_{10}$ „ + 0,1 % „
„	„	„ $\frac{1}{3}$ „ + 0,05 % „
„	„	„ $\frac{1}{3}$ „ + 0,25 % „
„	„	„ Nähragar + 2 % Harnstoff + 0,3 % Ammonkarbonat.
gute	gute	„ $\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,1 % $NaCO_3$ + 0,3% Ammonkarbonat.
„	„	„ $\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,1 % Na_2CO_3 + 0,2 % Harnstoff.
„	„	„ $\frac{1}{3}$ D-Agar + 0,1 % Na_2CO_3 + 2 % Harnstoff.
„	„	„ Harnstoff-Mineral-Agar.

1. Es geht aus den Versuchen hervor, daß erst ein Zusatz von Alkali die Entwicklung und Sporenbildung ermöglicht, daß diese aber durch Zusatz größerer Mengen von Alkali (Na_2CO_3) wieder gehemmt werden (siehe auch die quantitativen Versuche);

2. daß geringe Mengen Dextrose den normalen Entwicklungsgang begünstigen, größere Mengen ihn dagegen wieder hemmen.

3. daß ein Zusatz von Ammonkarbonat oder Harnstoff nur bei bestimmter Zusammensetzung des Nährbodens, sowie auch nur in bestimmten Mengenverhältnissen (siehe die genauen quantitativen Versuche p. 217) das Wachstum und die Sporenbildung begünstigt.

Die Reaktion des Nährbodens.

Maxima und Optima der Zusätze von Säure und Alkali, Ammonkarbonat und Harnstoff.

Ich stellte ferner das Maximum des Alkali- und Säurezusatzes, sowie das Optimum der Reaktion für meinen Stamm fest.

Als Nährboden verwendete ich lackmusneutralen ⅓ D-Agar, dem bestimmte, aber wechselnde Mengen Säure oder Alkali zugesetzt wurden; der fertige Nährboden wurde dann zu je 5 ccm in alkalifreie Jenaer Reagensröhren gefüllt und mit abgekochten (¼ Minute bei 100°) Sporen einer ausgereiften, normal vorbehandelten Kultur geimpft.

1. ⅓ D-Agar (lackmusneutral). Versuchstemperatur 28°.

Erst am 5. Tage nach der Impfung wurde eine schwache Trübung des Kondenswassers beobachtet. Nach 14 Tagen war ein dünner, kaum sichtbarer Belag an den Stellen, die das Kondenswasser berührt hatte, zu bemerken; mikroskopisch waren Stäbchen vorhanden, die Neigung zur Fadenbildung zeigten, Sporen wurden nur ganz vereinzelt beobachtet.

2. ⅓ D-Agar (lackmusneutral). +1 Tropfen n. H_2SO_4.

Tabelle I a.

Nährboden = ⅓ D-Agar + Natr. carbon. sicc.	Belag	Oidien	Sporen
1 Tropfen der Mol-Lsg. = 0,106 %	deutlich, dünn, häutig	ziemlich viel, meist normal	viel
2 „ „ „ = 0,212 %	sehr deutlich, häutig	weniger, meist normal	sehr viel
4 „ „ „ = 0,424 %	deutlich, dünn, häutig	weniger, meist normal	viel
6 „ „ „ = 0,636 %	deutlich, dünn, häutig	viel, z. T. geschwächt	viel
8 „ „ „ = 0,848 %	schwach sichtbar	viel, z. T. geschwächt	nicht viel
10 „ „ „ = 1,06 %	vereinzelt Kolonien	viel, z. T. geschwächt	vereinzelt
12 „ „ „ = 1,272 %	ganz vereinzelt Kolonien	wenig, z. T. geschwächt	ganz vereinzelt
14 „ „ „ = 1,484 %	nicht gebildet	wenig, geschwächt	keine
16 „ „ „ = 1,696 %	„ „	sehr wenig, geschwächt	„
18 „ „ „ = 1,908 %	„ „	vereinzelt Keimstäbchen	„
20 „ „ „ = 2,12 %	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
40 „ „ „ = 4,24 %	„ „	keine Keimstäbchen	„
60 „ „ „ = 6,36 %	„ „	keine Keimstäbchen	„

Tabelle I b.

Nährboden = ⅓ D-Agar + Ammon. carbon.	Belag	Oidien	Sporen
1 Tropfen der Mol-Lsg. = 0,157 %	sehr deutlich, dick, normal	wenig, normal	viel
2 „ „ „ = 0,314 %	sehr deutlich, dick, normal	sehr wenig, normal	sehr viel
4 „ „ „ = 0,628 %	sehr deutlich, dick, normal	wenig, normal	viel
6 „ „ „ = 0,942 %	sehr deutlich, dick	„ „	„
8 „ „ „ = 1,256 %	deutlich, dick	„ „	„
10 „ „ „ = 1,57 %	deutlich	mehr, normal	weniger
12 „ „ „ = 1,884 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
14 „ „ „ = 2,298 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
16 „ „ „ = 2,512 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
18 „ „ „ = 2,826 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
20 „ „ „ = 3,14 %	„	mehr, z. T. geschwächt	noch weniger
40 „ „ „ = 6,28 %	vereinzelt Kolonien	wenig, geschwächt	vereinzelt
60 „ „ „ = 9,42 %	ganz vereinzelt Kolonien	sehr wenig, geschwächt	keine
12,56 %	nicht gebildet	Keimstäbchen	„
15,7 %	„ „	vereinzelt Keimstäbchen	„
18,84 %	„ „	vereinzelt Keimstäbchen	„
21,98 %	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
25,12 %	„ „	keine Keimstäbchen	„

Nach 14tägigem Stehen bei 28° war nur mit der Lupe ein ganz dünner, häutiger Belag an den Stellen, die das Kondenswasser berührt hatte, zu bemerken. Mikroskopisch waren nur vereinzelte, geschwächte Stäbchen ohne Sporen vorhanden.

3. ⅓ D-Agar (lackmusneutral). + 2 Tropfen n. H_2SO_4.

Selbst nach wochenlangem Stehen bei 28° wurde kein Belag gebildet; mikroskopisch waren nur ganz vereinzelte Stäbchen vorhanden, die den Eindruck starker Schwächung machten.

Das Maximum des Säurezusatzes liegt also bei 2 Tropfen Normal-Schwefelsäure.

Um das Maximum des Alkalizusatzes und zugleich auch das Optimum des Alkalizusatzes zu bestimmen, wurden, wie aus den Tabellen zu ersehen ist, viele Versuche mit verschiedenen Mengen von Natriumkarbonat gemacht. Die gleichen Versuche wurden mit Ammonkarbonat und Harnstoff angestellt.

1. Das Natriumkarbonat wurde im Trockenschrank völlig entwässert, das Molekulargewicht beträgt dann 106. Diese Lösung wurde nun tropfenweise (siehe die Tabelle) dem lackmusneutralen Nährboden zugesetzt.

Das Maximum des Zusatzes von wasserfreiem Natriumkarbonat liegt bei etwas über 2 Proz., das Optimum etwa bei 0,2 Proz.

Tabelle I c.

Nährboden = ⅓ D-Agar +		Belag	Oidien	Sporen
0,2 %	Harnstoff	deutlich sichtbar, ziemlich dick, häutig	viel, normal	viel
2,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	„
3,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	weniger
5,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn, häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	„
6,0 %	„	deutlich sichtbar, dünn, häutig	viel, z. T. normal, z. T. dünn	„
9,0 %	„	sichtbar, dünn, häutig	viel, dünn, vakuolenreich	vereinzelt
10,0 %	„	„ „ „	„ „ „	„
12,0 %	„	kaum sichtbar, dünn, häutig	weniger, dünn, vakuolenreich	keine
15,0 %	„	kaum sichtbar, ganz dünn	weniger, dünn, vakuolenreich	„
18,0 %	„	kaum sichtbar, ganz dünn	weniger, dünn, vakuolenreich	„
21,0 %	„	nicht vorhanden	vereinzelt dünn, geschwächt	„
24,0 %	„	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
30,0 %	„	„ „	ganz vereinzelt Keimstäbchen	„
40,0 %	„	„ „	?	„

2. Als Ammoniumkarbonat wurde das anderthalbfach kohlensaure Ammonium des Handels, bestehend aus Ammoniumhydrokarbonat und Ammoniumkarbaminat ($NH_4\,HCO_3 + NH_4\,NH_2\,CO_3 = 79 + 78$). verwendet Von diesem Salz wurde in dem Lösungsverhältnis 157 : 1000 4,71 g in 30 ccm Wasser gelöst und tropfenweise (siehe die Tabelle) dem lackmusneutralen Nährboden zugesetzt; die größeren Mengen wurden jedoch in Substanz dem flüssigen Agar zugesetzt und darin gelöst.

Das Maximum des Zusatzes von anderthalbfachem kohlensauren Ammonium liegt zwischen 22 und 25 Proz., das Optimum etwa bei 0,3 Proz.

3. Der Harnstoff ($NH_2\,CO\,NH_2 = 60$) wurde meist in Substanz dem Nährboden zugesetzt.

Das Maximum des Zusatzes von Harnstoff liegt (siehe die Tabelle) **zwischen 30—40 Proz. Das Optimum des Zusatzes liegt unter 3 Proz. Harnstoff.**

Allgemeine Vorbehandlung zur Erzielung einheitlicher Kulturen.

Der im Marburger Institut befolgten Methode entsprechend, die isolierten Bakterien vor der Beschreibung mindestens 4 Wochen lang auf D-Agar zu züchten zur Erzielung einheitlicher, eventuell auch leichter vergleichbarer Kulturen, versuchte ich, das Wachstum der von mir isolierten Form dadurch zu erreichen, daß ich abgekochtes Sporenmaterial einer reifen, auf Harnstoffmineralagar (p. 214) gewachsenen Kultur als Impfmaterial auf D-Agar benutzte.

Das Wachstum auf D-Agar war aber — selbst wenn von nicht abgekochtem Sporenmaterial oder von kräftigen Oidien ausgegangen worden war — zumeist ein recht kümmerliches, oft trat auch gar kein Wachstum ein; ein andermal trat dagegen Wachstum und selbst Sporenbildung ein. Es gelang mir jedoch nicht — trotz vieler dahin zielender Versuche — eine Anpassung des Bacillus probatus an D-Agar zu erreichen, auch dann nicht, als der Nährboden mit Natriumkarbonat oder Kalziumkarbonat versetzt worden war. Es wurden dann weiter Versuche mit $1/3$, $1/5$, $1/10$ D-Agar und Peptonagar gemacht: Ein Wachstum trat wohl auf allen diesen, mit 0,1 Proz. Natriumkarbonat alkalisch gemachten Nährböden ein, aber die Entwicklung verlief doch nicht mit der gewünschten Regelmäßigkeit. Ausschlaggebend für das Verlassen dieser Nährböden war das kümmerliche und unsichere Wachstum des Beijerinckschen Originalstammes, wie besonders der mir von Herrn Prof. Löhnis freundlicherweise übermittelten harnstoffspaltenden Stämme; diese waren, wie mir brieflich mitgeteilt wurde, durch ungünstige Umstände stark geschwächt, ihr Sporenbildungsvermögen degeneriert.

Meine Versuche mit $1/3$ D-Agar, dem außer 0,1 Proz. Natriumkarbonat noch 0,2 Proz. Ammonkarbonat zugesetzt waren, führten schließlich zu einem Erfolge: Das Wachstum und die Sporenbildung waren auf diesem Nährboden durchweg gut; von größter Bedeutung war es auch für die später zu besprechenden vergleichenden Versuche mit den mir übermittelten Kulturen anderer Harnstoffspalter, daß auf diesem Nährboden, obgleich er harnstofffrei war, doch ein Wachstum aller von mir kultivierten Formen eintrat. Der Nährboden, den ich künftig kurz nur Ammon-Agar nennen werde, wurde, um eine Verdunstung des Ammonkarbonats zu vermeiden, in kleinen Rex-Konservenflaschen (bez. v. Rex-Gesellschaft, Homburg v. d. H.) sterilisiert.

Durch Abkochen des Bakterienmaterials der mir übermittelten, zum Teil stark geschwächten Stämme trat weitere Schwächung ein; ich versuchte daher mit Überimpfung des Oidienmaterials auszukommen. Es gelang mir nun durch sehr oftes, fast tägliches Überimpfen von kräftig schwärmendem Oidienmateriale, die geschwächten Stämme zu beleben und ihr Sporenbildungsvermögen anzuregen. Mein Originalstamm verhielt sich selbst nach 8 Monate langer Behandlung in der angedeuteten Richtung völlig konstant, in keiner der nahezu 200 Kulturgenerationen war eine Schwächung eingetreten, die Stäbchen waren normal und bildeten auch normale Sporen aus.

Als Vergleichsnährböden wurden ferner noch hergestellt und in oben angegebener Weise sterilisiert:

$1/3$ D-Agar + 0,1 Proz. Natriumkarbonat + 0,2 Proz. Harnstoff und $1/3$ D-Agar + 0,1 Proz. Natriumkarbonat + 2 Proz. Harnstoff. Auch auf diesen Nährböden zeigten bei meist täglicher Überimpfung mein Stamm wie die anderen Stämme und Arten Wachstum und Sporenbildung.

Auf den genannten drei Nährböden wurden nun die weiter unten beschriebenen Stämme und Spezies vor der genaueren beschreibenden und vergleichenden Untersuchung mindestens 4 Wochen in der angegebenen Weise bei der Versuchstemperatur von 28° kultiviert.

Dieses Kulturverfahren bezeichne ich als allgemeine oder normale Vorbehandlung: es ist also in unserem Falle unter allgemein vorbehandeltem Bakterienmaterial ein solches zu verstehen, das auf einem näher bezeichneten Nährboden erhalten wurde durch mindestens 3—4 Wochen lange Kultur bei 28° und durch nahezu tägliches Überimpfen nicht abgekochter Zellen 1—2 Tage alter Kulturen.

Einfluß der Nichtabkochung des Bakterienmaterials vor der Umimpfung auf die Entwicklung und das Sporenbildungsvermögen.

Nach den Angaben in der Literatur wurde bei dem Überimpfen nicht abgekochten Bakterienmaterials meist eine Schwächung oder ein Verlust des Sporenbildungsvermögens beobachtet.

Nach Lehmann (1887) verloren die lange auf Gelatine gezüchteten Milzbrandbakterien die Fähigkeit, Sporen zu bilden; während die Virulenz ungeschwächt war, konnte selbst durch 10 Tierpassagen keine Sporenbildung mehr erzielt werden.

Beijerinck (1901. p. 45) sagt: „Bei wiederholtem Überimpfen geht das Vermögen zur exzessiven Sporenbildung verloren. Dieses beruht darauf, daß man ohne bestimmte Fürsorge, stets mehr vegetative Stäbchen wie Sporen überimpft, und viele dieser Stäbchen das Vermögen zur Sporenbildung vollständig verloren. Wird das übergeimpfte Material zuvor pasteurisiert, so daß nur Sporen zur Aussaat kommen, so bleibt die Sporenbildung und deshalb die übergeimpfte Kultur völlig konstant".

Bredemann (1909. p. 25) sagt hierzu: „Was die Abkochung der Sporen vor jedem Umimpfen anbelangt, so wurde dieselbe, ebenso wie von Gottheil (1901) und Neide (1904) auch von mir stets angewandt. Die geringe Benachteiligung, die, wie Garbowski (1907) auch für Bac. tumescens und Bac. luteus zeigte, durch die Abkochung der Sporen hervorgebracht wird, hat mich nicht abgehalten, stets vor jeder Umimpfung ein Abkochen der Sporen vorzunehmen, weil der eventuelle geringe Nachteil dieser Methode gegenüber dem Vorteil, der darin liegt, daß sich zur Nichtsporenbildung neigende Varianten nicht erhalten werden, gar nicht in Betracht kommt. Es ist nicht zu bezweifeln, daß es nur der vor jeder Überimpfung stattgehabten Abkochung zuzuschreiben ist, daß sich in den untersuchten Stämmen der Entwicklungszyklus von Spore zu Spore immer in glatter Weise vollzog, und ist bei Nachprüfung dieser Resultate das größte Gewicht darauf zu legen, daß dies Abkochen innegehalten wird, weil sonst die Stämme bald zurückgehen werden."

Kruse (1910. p. 137) schreibt: „Durch fortgesetzte, frühzeitige Übertragung der Bakterien auf neue Nährböden kann man die Sporulation dauernd unterdrücken."

Es geht hieraus hervor, daß bei Benutzung der gewöhnlichen Nährsubstrate durch die Abkochung des Materials einer Abnahme des Sporenbildungsvermögens bis zu gewissem Grade vorgebeugt werden kann. Etwas anders lauten die Ergebnisse Garbowskis.

Garbowski (1909; Diss. p. 5) sagt diesbezüglich folgendes: „Bei der Untersuchung der Entwicklung von Bac. luteus Smith et Baker ging ich nach den von Prof. Arth. Meyer und seinen Schülern ausgearbeiteten Methoden vor, mit dem einzigen Unterschied, daß ich die übliche „Abkochung" der Sporen (Gottheil 1901, Neide 1904) nicht anwendete, und zwar aus zwei Gründen: erstens fruktifizierten die von mir untersuchten Spezies auf einem geeigneten Nährmedium (⅓ D-Agar) so vollkommen, daß ich immer über für meine Zwecke genügend reines Sporenmaterial verfügte und zu keinen besonderen Mitteln zwecks Reinigung des Aussaatmaterials von vegetativen Formen Zuflucht zu nehmen brauchte, und zweitens weil ich mich überzeugte, daß der Entwicklungszyklus von Spore zu Spore bei dem nicht abgekochten Material rascher und vollkommener sich in der ganzen Kultur abspielte, als bei dem auch nur ganz kurz abgekochten.

Garbowskis Erfahrung könnte damit zusammenhängen, daß die Sporen seiner Spezies ganz besonders empfindlich waren gegen das Abkochen.

Es wäre aber auch wohl denkbar, daß unter Umständen durch die stetige, verhältnismäßig lange Kultur auf einem durch die Exkrete der Bakterien verunreinigten Nährboden eine Schwächung selbst der Sporen eintreten könnte.

Das ist vielleicht bei meiner Spezies der Fall gewesen, denn es gelang mir nicht, geschwächte Kulturen auf günstigem Nährsubstrat zu besserer Sporenbildung zu bringen, wenn ich das sporenarme Material vor der Umimpfung abkochte und die Kulturen, von diesem abgekochten Sporenmateriale ausgehend, wieder bis zur Sporenbildung auf demselben Nährboden wachsen ließ.

Eigene Versuche mit der von mir benutzten Methode.

Wie ich schon im Abschnitte der „Allgemeinen Vorbehandlung“ hervorgehoben habe, wurde junges, meist 24stündiges, kräftig schwärmendes Oidienmaterial fast täglich auf frische Kulturröhrchen von ⅓ D-Agar 1) mit 0,2 Proz. Ammonkarbonat, 2) mit 0,2 Proz. Harnstoff und 3) mit 2 Proz. Harnstoff übergeimpft. Die Nährböden enthielten je 0,1 Proz. Natriumkarbonat.

Es stellte sich bei diesen Versuchen, die außer mit meinem Stamm auch mit anderen Stämmen, ferner mit Sarcina ureae gemacht wurden, heraus, daß — im Einklang mit Garbowskis Beobachtungen und im Gegensatz zu den herrschenden Anschauungen (siehe oben) — das Sporenbildungsvermögen nicht geschwächt oder ganz unterdrückt, sondern gerade gestärkt wurde durch die häufige Übertragung kräftiger Zellen auf frische stoffwechselfreie Nährböden. •Gleichzeitig beobachtete ich bei diesem Zuchtverfahren eine gleichmäßigere Ausbildung der Zellen bezüglich ihrer Gestalt und Größe und, in Bestätigung der Untersuchungen von Ellis (1901), auch eine wesentlich stärkere Schwärmfähigkeit.

Die Versuche waren unter optimalen Bedingungen vorgenommen worden, d. h. mit ganz jungem Materiale, das also so noch nicht durch die eigenen Stoffwechselprodukte geschwächt sein konnte und immer wieder auf günstige Nährböden übertragen und bei 28° C gezüchtet wurde.

Es ist mir also gelungen, das Sporenbildungsvermögen so wieder zu erhöhen; es zeigte sich auch, daß selbst nach monatelanger Kultur keine Schwächung des Sporenbildungsvermögens eintrat. Die Berücksichtigung optimaler Bedingungen möchte ich im Hinblick auf meine Resultate nochmals betonen; die abweichenden Resultate anderer Forscher hängen vielleicht damit zusammen, daß die von ihnen innegehaltenen Kulturbedingungen keine optimalen waren.

Einfluß der Strichüberimpfung bei nicht optimaler Temperatur auf Entwicklung und Sporenbildungsvermögen.

Verschiedene Autoren, Pasteur, Chamberland und Roux (1881), Chamberland und Roux (1883) und Roux (1890) haben früher beobachtet, daß Kulturen von Pest- und Milzbrandbazillen durch Züchtung bei 42° die Fähigkeit zur Sporenbildung verloren; ich untersuchte

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

daher nun den Einfluß der auch für Bac. probatus supraoptimalen Temperatur auf sein Sporenbildungsvermögen.

Es wurden täglich Strichüberimpfungen nicht abgekochten 24-stündigen Oidienmateriales vorgenommen und alle Kulturen bei 42° im Brutschrank aufbewahrt und nur zur Überimpfung herausgenommen. Durch die Kultur bei 42° trat eine deutliche Schwächung der Wachstumsfähigkeit und des Sporenbildungsvermögens ein; das Maximum der Sporenbildung liegt zwischen 42° und 43°. Die häufige Überimpfung bei 42° zeitigte nun aber eher eine Anpassung an die maximale Temperatur als eine Schwächung des Sporenbildungsvermögens.

Tabelle II a.

Überimpfung	Datum der Abimpfung	Versuchs-Temperatur	Versuchsmaterial: 25. Strichgeneration		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	17. I.	17°	dick, schleimig	wenig	viel
2.	25. I.	"	" "	"	"
3.	3. II.	"	dünn, häutig	viel	wenig
4.	6. III.	"	dick, schleimig	viel, Fäden	mehr
5.	14. III.	"	dünn, häutig	viel, dünn u. lang	"
6.	23. III.	"	" "	" " " "	"
7.	30. III.	"	" "	" " " "	"
8.	7. IV.	"	" "	" " " "	"
9.	15. IV.	"	" "	" " " "	"
10.	23. IV.	"	" "	wenig, dünn und lang	"
11.	4. V.	"	" "	sehr wenig, dünn und lang	vereinzelt
1.	17. I.	28°	dick, schleimig	wenig	sehr viel
2.	25. I.	"	" "	"	" "
3.	3. II.	"	" "	"	" "
4.	6. III.	"	" "	"	" "
5.	14. III.	"	" "	sehr wenig	fast ausschließlich
6.	23. III.	"	" "	" "	"
7.	30. III.	"	" "	" "	"
8.	7. IV.	"	" "	" "	"
9.	15. IV.	"	" "	" "	"
10.	23. IV.	"	" "	" "	"
11.	4. V.	"	" "	" "	"
1.	17. I.	42°	deutlich, häutig	viel, z. T. dünn, z. T. Fäden	wenig
2.	25. I.	"	dünn, häutig	"	"
3.	3. II.	"	" "	"	"
4.	6. III.	"	deutlich, schwachschleimig	"	mehr
5.	14. III.	"	"	"	"
6.	23. III.	"	"	"	"
7.	30. III.	"	"	"	"
8.	7. IV.	"	dünn, häutig	wenig, z. T. dünn z. T. Fäden	wenig
9.	15. IV.	"	" "	"	"
10.	23. IV.	"	" "	"	"
11.	4. V.	"	" "	sehr wenig, z. T. dünn, z. T. Fäden	vereinzelt

Tabelle II b.

Überimpfung	Datum der Abimpfung	Versuchs-Temperatur	Versuchsmaterial: 40. Strichgeneration		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	17. I.	17°	dick, schleimig	wenig	viel
2.	25. I.	„	„ „	wenig Fäden	
3.	3. II.	„	dünn, häutig	viel, Fäden	wenig
4.	6. III.	„	„ „	viel, dünn u. lang	sehr wenig
5.	14. III.	„	„ „	„ „ „ „	„ „
6.	23. III.	„	deutlich, häutig	vorwiegend normale	mehr
7.	30. III.	„	„ „	„ „	viel
8.	7. IV.	„	deutlich, schleimig	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	wenig	„
11.	4. V.	„	„ „	wenig, z. T. Fäden	„
1.	17. I.	28°	dick, schleimig	sehr wenig	sehr viel
2.	25. I.	„	„ „	„ „	„ „
3.	3. II.	„	„ „	„ „	„ „
4.	6. III.	„	„ „	„ „	fast ausschließlich
5.	14. III.	„	„ „	„ „	„
6.	23. III.	„	„ „	„ „	„
7.	30. III.	„	„ „	„ „	„
8.	7. IV.	„	„ „	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	„ „	„
11.	4. V.	„	„ „	„ „	„
1.	17. I.	42°	deutlich, schwach-schleimig	viel, z. T. geschwächt	nicht viel
2.	25. I.	„	„	„	„ „
3.	3. II.	„	„	„	„ „
4.	6. III.	„	„	weniger, meist normal	viel
5.	14. III.	„	„	„	„
6.	23. III.	„	„	„	„
7.	30. III.	„	„	„	„
8.	7. IV.	„	„	„	„
9.	15. IV.	„	„	„	„
10.	23. IV.	„	„	„	„
11.	4. V.	„	dünn, häutig	wenig, Kultur geschwächt (Austrocknung?)	nicht viel

Die bei 43° und 44° gezüchteten Kulturen zeigten weitgehende Schwächung des Wachstums, Sporen wurden bei diesen Temperaturen nicht mehr ausgebildet. Wurden diese Kulturen aber nachträglich bei 28° oder Zimmertemperatur hingestellt, so trat wieder, wenn auch ganz vereinzelt in den bei 44° C gezüchteten Kulturen, Sporenbildung ein, vorausgesetzt, daß der Nährboden nicht ganz ausgetrocknet war.

Es war also nicht möglich gewesen, durch Kultur bei maximalen Temperaturgraden und täglicher Überimpfung das Sporenbildungsvermögen zu unterdrücken; ja die geschwächten Kulturen erholten sich wieder, wenn sie nachträglich übergeimpft und unter optimalen Bedingungen weiter kultiviert wurden.

Tabelle II c.

Über-impfung	Datum der Abimpfung	Versuchs-Tem-peratur	Versuchsmaterial: 40. Strichgeneration. ¼ min. bei 100_0 abgekochtes Material		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	17. I.	17°	dick, schleimig	wenig	viel
2.	25. I.	„	„ „	„	„
3.	3. II.	„	dünn, häutig	viel	weniger
4.	6. III.	„	deutlich, häutig	wenig	mehr
5.	14. III.	„	deutlich, schleimig	„	viel
6.	23. III.	„	„ „	„	„
7.	30. III.	„	„ „	„	„
8.	7. IV.	„	dick, schleimig	„	„
9.	15. IV.	„	„ „	„	„
10.	23. IV.	„	„ „	„	„
11.	4. V.	„	„ „	wenig, z. T. Fäden	sehr viel
1.	17. I.	28°	dick, schleimig	wenig	sehr viel
2.	25. I.	„	„ „	„	„ „
3.	3. II.	„	„ „	„	„
4.	6. III.	„	„ „	sehr wenig	fast ausschließlich
5.	14. III.	„	„ „	„ „	„
6.	23. III.	„	„ „	„ „	„
7.	30. III.	„	„ „	„ „	„
8.	7. IV.	„	„ „	„ „	„
9.	15. IV.	„	„ „	„ „	„
10.	23. IV.	„	„ „	„ „	„
11.	4. V.	„	„ „	„ „	„
1.	17. I.	42°	deutlich, schwach-schleimig	viel, z. T. dünn	nicht viel
2.	25. I.	„	„	„ „ „ „	„ „
3.	3. II.	„	„	„ „ „ „	„ „
4.	6. III.	„	„	„ „ „ „ Fäden	wenig
5.	14. III.	„	„	viel	mehr
6.	23. III.	„	„	weniger, meist normal	„
7.	30. III.	„	„	„	„
8.	7. IV.	„	„	„	„
9.	15. IV.	„	„	„	viel
10.	23. IV.	„	„	„	„
11.	4. V.	„	dünn, häutig	wenig, geschwächte Kultur	nicht viel

Dasselbe Resultat zeitigten Versuche, die unter sonst gleichen Bedingungen auf Ammon-Agar bei durchschnittlich 17° gemacht wurden. (Die Temperatur schwankte von 13—19°.)

Es schien nun angebracht, den Einfluß der „Strichüberimpfung" bei den Temperaturen 17°, 28° und 42° zu verfolgen, wenn das Impfmaterial nicht täglich, sondern nur alle 8 Tage oder gar in einem Zwischenraum von 4 Wochen übergeimpft wurde, also durch die eigenen Stoffwechselprodukte geschwächt sein konnte. Diese Versuche, die nahezu 4 Monate lang fortgesetzt wurden, hatten das Ergebnis, daß auch hier in keinem Falle eine Unterdrückung des Sporenbildungsvermögens beobachtet werden konnte; die Kulturen waren allerdings nicht ganz so kräftig und enthielten nicht so viel

Tabelle II d.

Über-impfung	Datum der Überimpfg.	Versuchs-Tem-peratur	Versuchsmaterial: 30. Strichgeneration auf Ammon-Agar		
			Belag	Oidien	Sporen
1.	8. XII.	17°	deutlich, schleimhäutig	viel, z. T. fädig	nicht viel
2.	16. XII.	„	„	„ „ „ „	„ „
3.	22. XII.	„	„	„ „ „ „	„ „
4.	4. I.	28°	„	„ „ „ „	ziemlich viel
5.	5. I.	„	dick schleimhäutig	nicht viel, normal	„
6.	6. I.	„	dick, schleimig	„ „ „	viel
7.	7. I.	„	„ „	„ „ „	„
8.	8. I.	„	„ „	„ „ „	„
9.	9. I.	„	„ „	„ „ „	„
10.	11· I.	„	„ „	„ „ „	„
1.	8. XII.	42°	deutlich, schleimhäutig	viel z. T. fädig	wenig
2.	16. XII.	„	„	viel, z. T. dünn und fädig	„
3.	22. XII.	„	„	„	„
4.	4. I.	28°	„	viel, vorwiegend normal	ziemlich viel
5.	5. I.	„	dick, schleimhäutig	wenig ,vorwiegend normal	„
6.	6. I.	„	deutlich, schleimig	„	„
7.	7. I.	„	dick, schleimig „ „	„	„
8.	8. I.	„	„ „	„	sehr viel
9.	9. I.	„	„ „ „ „	sehr wenig, sehr wenig, normal	fast ausschließlich
10.	1.1 I.	„	„ „	„ „ „	„
1.	3. I.	17°	dünn, häutig	viel, z. T. dünn, fädig	vereinzelt
2.	4. I.	„	„ „	„	„
3.	5. I.	„	deutlich, häutig	„	mehr
4.	6. I.	„	„ „	viel, vorwiegend normal	„
5.	7. I.	„	„ „	„	„
6.	8. I.	„	„ „	„	„
7.	9. I.	„	„ „	„	„
8.	10. I.	„	„ „	„	„
9.	11. I.	„	„ „	„	„
10.	12. I.	„	„ „	„	„
1.	4. VI.	43°	ganz dünn, hauchartig	nicht viel, dünn, geschwächt	keine
2.	5. VI.	„	„	„	„
3.	6. VI.	„	„	„	„
4.	7. VI.	„	„	„	„
5.	8. VI.	„	„	„	„

Sporen, als die unter gleichen Temperaturverhältnissen gezüchteten, aber täglich übergeimpften; am deutlichsten war noch die geringe Schwächung der Kulturen, die aus dem 4 Wochen nicht übergeimpften Materiale erwachsen waren.

Zu berücksichtigen ist bei den Resultaten auch noch der schädigende

Einfluß der Austrocknung bei Kulturen, die nicht abgeschlossen und wie hier z. T. noch höheren Temperaturgraden ausgesetzt wurden.

Ganz im allgemeinen läßt sich wiederholenderweise, wenigstens für die von mir untersuchten Stämme, aussagen, daß das Sporenbildungsvermögen allein durch Strichüberimpfung nicht abgekochten Materials keineswegs unterdrückt wird.

Eine Schwächung kann eintreten, ist dann aber wohl die Folge einer allgemeinen Schwächung der Zellen. Ist diese nicht zu weit fortgeschritten, so läßt sich durch Kultur bei optimalen Bedingungen wieder eine Kräftigung der Zellen und damit auch wieder die Ausbildung von Sporen hervorrufen.

Einfluß von Giften, Säuren und Alkalien auf das Sporenbildungsvermögen.

Wir werden später (p. 266 ff.) bei der Besprechung der Widerstandsfähigkeit von Sporen und Oidien gegen Giftlösungen sehen, daß auch durch Giftzusatz zum Nährboden eine dauernde Asporogenität meines Originalstammes nicht zu erzielen war, ebensowenig vermochten Säuren (p. 265) oder Alkalien (p. 216 ff.) das Sporenbildungsvermögen dauernd zu unterdrücken.

Einfluß von Alkali auf die Sporenbildung.

Über den Einfluß von Alkali auf die Sporenbildung liegen mehrere Angaben vor (Literatur bei Pringsheim 1910. p. 157 und bei Garbowski, p. 21 der Diss. 1907). Behring erwähnt (1889, 1890), daß es ihm gelungen sei, durch Zusatz von 0,12 Proz. NaOH zum Nährboden asporogene Rassen vom Milzbrandbacillus zu züchten. Garbowski (1907) setzte seinem Kulturnährboden: Fleischextrakt-Peptonagar wechselnde Mengen Sodalösung zu und impfte ihn mit Bacillus luteus. Das zugesetzte Natriumkarbonat beeinträchtigte zwar die Sporenbildung, beeinflußte aber auch die vegetative Entwicklung, so daß es nicht gelang, lebensfähige Kulturen heranzuzüchten, die völlig sporenfrei waren; eine asporogene Rasse hat er also durch Zusatz von Alkali zum Nährboden nicht erhalten können.

Aus der beigegebenen Tabelle (Tabelle No. II a—d) ist diese Abhängigkeit der Sporenbildung von der Entwicklung der Zellen deutlich zu ersehen.

Nach den von uns gemachten Erfahrungen ist das Sporenbildungsvermögen das am leichtesten zu schwächende; es war jedoch nicht möglich, Verhältnisse zu schaffen, bei denen zwar die dauernde normale Entwicklungsfähigkeit der Zellen erhalten blieb, aber das Sporenbildungsvermögen völlig und dauernd unterdrückt wurde.

Kapitel 2.

Allgemeine morphologische Eigenschaften.

Normale Wuchsformen der Morphoden.

Endosporen. — Größenmessungen.

Form. Die kugelige Gestalt herrscht vor; es wurden jedoch auch elliptische, eiförmige und zylindrisch-walzenförmige Sporen beobachtet (Fig. 1—3).

Größe. Größenmessungen im allgemeinen. Die Größenmessungen der verschiedenen Morphoden und Geißeln wurden in allen Fällen in der von Prof. Meyer (1903. p. 69) angegebenen und wie folgt abgeänderten Weise vorgenommen: Mit dem Zeichenapparat wurde das gerade 2400-fach vergrößerte Objekt — stets in Wasser liegend — aufgezeichnet und bei den Zeichnungen möglichst ein ganzes Gesichtsfeld berücksichtigt. Um gute Durchschnittswerte und möglichst alle in der Kultur ausgebildeten Zellgrößen in das mikroskopische Präparat zu bekommen, wurde der Bakterienrasen von dem Kulturboden mit sterilem Wasser in ein kleines Gläschen geschwemmt, gemischt und von dieser Mischung, schwach milchig getrübt, ein kleines Tröpfchen auf den Objektträger übertragen.

Um die Sporen, die manchmal lebhafte Molekularbewegung zeigen. zur Ruhe zu bringen, wurde dafür gesorgt, daß sich eine möglichst dünne Flüssigkeitsschicht zwischen Objektträger und Deckglas befand, ferner daß größere Luftblasen im Präparate vorhanden waren; man kann auch das mikroskopische Präparat mit einem Wachsrande zuschließen, muß aber dann gewöhnlich längere Zeit bis zum völligen Absetzen der Sporen warten. Ein Zusatz von Farblösung oder von Säure beschleunigt bekanntermaßen das Absetzen der Zellen und erleichtert das Zeichnen, ist aber aus folgenden Gründen, selbst vorausgesetzt, daß man den Zusatz ausdrücklich betont, im allgemeinen nicht zu empfehlen: Durch den Zusatz von Farblösungen oder von Säuren wird die Größe der Zellen verändert, entweder quillt oder schrumpft sie und zwar, da der Zusatz dieser Mittel nie gleich stark bemessen werden kann, verschieden stark.

Je größer nun die Anzahl der gezeichneten Zellen, desto größer natürlich auch die Genauigkeit des Resultates; zur Festlegung der Variationskurve, z. B. für Sporen, wurden meist 100 Stück gezeichnet. Zum Zeichnen stellt man den Rand der betr. Zelle scharf ein, das Plasma erscheint dann weniger stark lichtbrechend, zieht mit einem sehr spitzen Bleistift (Kohinur, Härte etwa 4—5 H.) die Randkonturen genau nach und überzeugt sich, daß sich die Konturen der Zeichnung mit denen der Zelle decken. Wo das Nachziehen der Konturen mit dem Bleistift Schwierigkeiten macht, z. B. bei sehr feinen Gebilden wie den Geißeln, empfiehlt es sich, gerade, gleichmäßig in ihrer Dicke etwas voneinander abweichende, der beobachteten Zellgröße aber annähernd entsprechende Bleistiftstriche zu machen und unter Zuhilfenahme des Zeichenprismas mit der Zelle durch Deckungsversuche direkt zu vergleichen.

Die Messungen wurden dann mit einem auf Veranlassung von Herrn Prof. Meyer von der Firma Seibert in Wetzlar gelieferten Maßstabe vorgenommen.

Auf dem Maßstabe waren 20 μ in 2400-facher Vergrößerung = 4,8 cm, geteilt in 100 Grade, eingeritzt und durch Farbstoff gebläut worden; der Abstand eines Teilstriches vom anderen entsprach so 0,2 μ; der 5. Teilstrich war jedesmal nach oben und unten verlängert worden, um dadurch die ganzen μ-Grade besser hervorzuheben; von 5 zu 5 μ waren entsprechende Zahlen an den Strichen angebracht. Der Maßstab wurde zur Messung mit der eingeritzten Seite auf die Zeichnung gelegt und die Messung der gezeichneten Bakterien mit der Lupe vorgenommen; 0,1 μ und darunter lassen sich auf diese Weise noch recht gut messen oder abschätzen.

Da die Zusammensetzung des Nährbodens von großem Einfluß auf die Sporengröße sein kann, wurden Sporen gemessen, die auf verschiedenen Substraten gewachsen waren.

So betrug die Größe der Sporen, die

1. einer 2 Monate alten, auf Harnstoff-Mineralagar gezüchteten Kultur entnommen waren:

Kugelige Sporen — Variationsbreite 0,6—1,0 µ.
Längliche Sporen — vorwiegend 0,8 : 0,9 µ.
Ihre Form war meist kugelig.
Ihre Größe betrug meist 0,9 µ.

2. einer 3 Wochen alten Kartoffel-Kreidekultur entstammten:

Kugelige Sporen — Variationsbreite 0,6—1,1 µ.
Längliche Sporen — einzelne 0,8 : 1.2, µ
Ihre Form war meist kugelig.
Ihre Größe betrug meist 0,9 µ.

3. auf Ammon-Agar gewachsen und 4 Wochen alt waren:

Kugelige Sporen — Variationsbreite 0,6—1,0 µ.
Längliche Sporen — vereinzelt, Breite 0,5, Länge 1,2 µ.
Die Durchschnittsform war kugelig.
Die Durchschnittsgröße war 0,8 µ.

Der Unterschied der Sporengrößen auf den genannten Kulturböden ist hier nicht so groß, weil diese keinen für das Wachstum und die Sporenbildung schädlichen Einfluß ausübten.

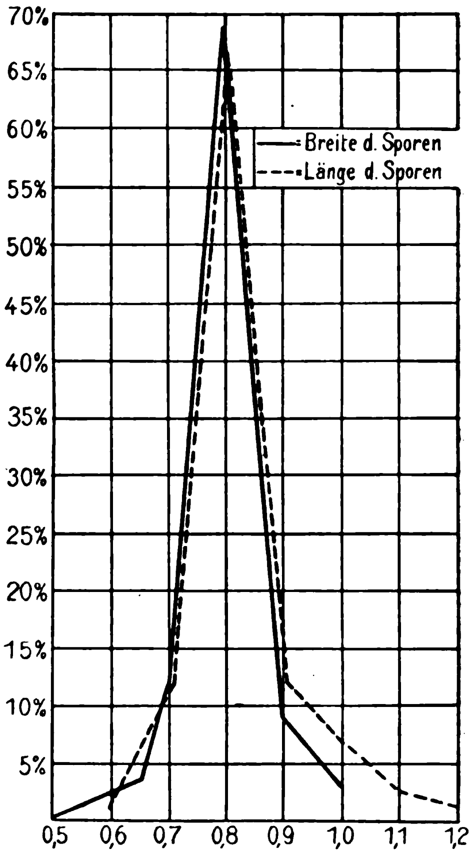
Variationskurve für Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden je 100 Sporen der 1., 30., 60. und 90. Kulturgeneration auf Ammon-Agar gemessen, im ganzen also 400 Sporen. Die Messungen ergaben:

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	µ
Länge		6	47	269	36	27	10	5	Stück
Breite	2	15	48	275	48	12			„

Die Größe der kugeligen Sporen wurde bei Aufstellung dieser Zahlen der Sporenlänge und Sporenbreite in gleicher Weise berücksichtigt, und zwar so, daß bei einer kugeligen Spore z. B. der Größe 0,9 µ sowohl die Länge, als auch die Breite mit 0,9 µ berechnet wurde.

Da die Sporen vorwiegend kugelig sind, so fällt auch die Kurvenspitze der Sporenbreite mit der der Länge annähernd zusammen.



1 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße länglicher Sporen:

Länge	0,8	1,0	1,0	1,1	1,2	µ
Breite	0,6	0,8	0,9	0,9	0,9	„
Stück	1	1	1	9	4	

Sporengröße kugeliger Sporen:

Länge	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	µ
Stück	1	11	60	9	3	

30 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße länglicher Sporen: kugeliger Sporen:

Länge	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0	1,2	µ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	µ
Breite	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	1,0	„						
Stück	3	1	2	6	1	1		1	7	66	8	3	

60 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße	länglicher Sporen:							kugeliger Sporen:					
Länge	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	1,1	μ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	μ
Breite	0,6	0,6	0,7	0,8	0,9	0,9	„						
Stück	1	2	1	4	1	1		1	10	68	8	3	

90 Strichkultur auf Ammon-Agar.

Sporengröße	länglicher Sporen:						kugeliger Sporen:					
Länge	0,7	0,8	0,9	1,0	1,0	μ	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	μ
Breite	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	„						
Stück	2	2	2	1	1		3	16	67	5	2	

Sporenmembran.

Die Membran der Sporen war ohne Färbung wegen der Kleinheit des Objektes nicht deutlich zu sehen; bei Färbung mit Methylenblaulösung (1 + 10) schien die Exine etwas dunkler blau gefärbt zu sein, als die Intine. Die Membran enthält Chitin.

Sporangienmembran.

Die Sporen waren in jungen Kulturen nur selten frei anzutreffen; freie Sporen wurden beobachtet in 14 Tage alter Ammon-Agarkultur und weiter z. B. in 8 Tage alter Kartoffelkultur; in 40 Tage alter Harnstoff-Mineralagarkultur und in 6 Monate alter Ammon-Agarkultur waren vorwiegend freie Sporen vorhanden.

Entweder haften kaum sichtbare Reste der Sporangienmembran an der Spore (Fig. 1) oder ein Teil des Sporangiums umgibt hüllenartig oder kapselartig die Spore (Fig. 2 u. 3).

Diese Erscheinung trat besonders im Laufe der künstlichen Kultivierung häufig auf, während sie im Anfange nur selten beobachtet worden war; ich komme auf diese Hüllen-Hemangienbildung noch näher zu sprechen.

Sporenkeimung.

Die Sporenkeimung erfolgte auf günstigen Nährböden meist nach 5—6, auf Ammon-Agar schon nach 5 Stunden. Freie längliche Sporen keimten vorwiegend äquatorial, zuweilen auch polar (Fig. 6, 52; 5, 8). Die Anschwellung der Sporen vor der Keimung war wohl zu beobachten, aber nicht sehr erheblich. Der Keimschlauch trat bei den in Sporangien eingeschlossenen Sporen entweder seitlich oder an der Basis aus; auch an der Spitze des Sporangiums wurde einmal eine Keimung beobachtet (Fig. 7). Es scheint so zu sein, daß die Spore an der wenigst oder gar nicht ausgebildeten Stelle der Sporangienmembran ihren Keimschlauch hindurchschiebt; die vor der Keimung freiwerdenden Sporen treten wohl auch an diesen Stellen aus der Sporangienhülle heraus (siehe auch das p. 230 Gesagte).

Keimstäbchen.

Eine Teilung des bei der Sporenkeimung heraustretenden, zum Teil noch in der Hülle befindlichen Keimstäbchens konnte nicht beobachtet werden (Fig. 8, 52). Die Stäbchen begannen sofort zu schwärmen; es gelang auch die Geißeln in meist geringer Anzahl und feiner Ausbildung sichtbar zu machen (Fig. 8, 52). Größe der Keimstäbchen auf Ammon-Agar: Breite 0,4—0,6 μ, Länge 2—4 μ, meist 3 μ.

Oidien.

Die aus den Keimstäbchen hervorgehenden Oidien sind in 15 Stunden alter, auf Ammon-Agarkultur bei 28° gewachsener Kultur reichlich anzutreffen.

Form. Ihre Form ist meist eine 1-stäbige bis 3-stäbige (Fig. 12—23); die Enden sind deutlich abgerundet. Die Stäbchen sind gewöhnlich annähernd 1 μ lang, es kommen aber auch 2—3 μ lange, ein- und mehrzellige Stäbchen vor und zwar wurden sie häufiger auf alkalischer Nährgelatine beobachtet (Fig. 18 u. 19).

Größe. Die Stäbchengröße schwankt sehr, je nach der Zusammensetzung des Nährbodens; ja sie schwankt sogar erheblich in ein und demselben Nährboden (Fig. 12—23).

So fand ich auf Ammon-Agar (2 Tage alte Kultur der 69. Generation) Oidien folgender Größe:

Breite 0,6—1,1 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge 2—22 μ, ,, 2—4 μ,

auf Kartoffelscheiben, die mit 1 ccm einer 2-proz. Anschüttelung von $CaCO_3$ in H_2O getränkt waren, nach 2 Tagen:

Breite 0,6—1,1 μ, vorwiegend 0,9 μ
Länge 2—5 μ, ,, 3 μ,

auf ⅓ D-Agar + 0,25 Proz. Na_2CO_3 + (3 Tage alte Kultur)
Breite 0,5—0,8 μ, vorwiegend 0,7 μ
Länge 2—5 μ, ,, 3 μ,

auf ⅓ D-Agar + 1 Proz. Na_2CO_3
Breite 0,5—1 μ, vorwiegend 0,7 μ
Länge 2—10 μ, ,, 3—5 μ,

auf Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3
Breite 0,8—1 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge 3—20 μ, ,, 5—10 μ,

auf Harnstoffmineral-Agar
Breite 0,6—0,8 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge 2—4 μ, ,, 3 μ,

auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff
Breite vorwiegend 0,4—0,6 μ
Länge ,, 3—5 μ.

In Nährlösungen, wie z. B. den Nährlösungen 0, 1, 11, sowie in Bouillon trat bei ausreichender Alkalität dieser Nährmedien die Ausbildung normaler Oidien ein:

Breite 0,6—0,8 μ, vorwiegend 0,8 μ
Länge ,, 3—4 μ.

Jedoch wurde in den flüssigen Nährböden häufiger Fadenbildung beobachtet, als in festen Nährmedien.

Die Fäden hatten meist eine Breite von 0,6 μ und eine recht verschiedene Länge; es wurden 20—40 μ lange Fäden und in Bouillon sogar ein 103 μ langer Faden gemessen.

Sporangien.

Am 3. Tage bilden sich, wenn man von Sporen ausgeht, in der bei 28° C gehaltenen Kultur von Ammon-Agar Sporenanlagen und zwar in der für Bac. asterosporus (A. Meyer, 1897) beschriebenen Weise.

Form. Die Stäbchen schwellen bei der Sporenbildung meist am Ende an, entweder bauchig, keulig, trommelschlägerförmig oder clostridienförmig (Fig. 24—33). Die Clostridien- und Trommelschlägerform herrscht vor. Der Sitz der Spore ist gewöhnlich dem einen Sporangienende genähert, es kommen aber auch Abweichungen vor, so daß man auch solche Sporangien finden kann, bei denen die Spore in oder nahe der Mitte des sporangiumbildenden Stäbchens liegt (Fig. 25, 57).

Auf Ammon-Agar wurde auch einmal ein Sporangium mit 2 Sporen beobachtet.

Größe. Die Größe der Sporangien ist wie die der Oidien, aus denen sie ja entstehen, eine schwankende; so wurden 3—6 μ lange Sporangien beobachtet; zumeist waren sie 3—4 μ lang, weshalb diese Größe auch als die Normalsporangiengröße bezeichnet wird.

Die Sporangien sind zum Teil lebhaft beweglich, es gelang mir mit der Geißelfärbung Geißeln daran nachzuweisen (Fig. 33, 57).

Die Membran der Sporangien enthält Chitin.

Das Freiwerden der Sporen tritt auf Ammon-Agar zumeist erst nach 14 Tagen oder später ein.

Beim Freiwerden trat die Spore entweder aus dem Sporangium heraus, oder sie verblieb, was meistens der Fall war, im Sporangium, das sich in ganz eigenartiger Weise umgestaltete. Der untere, sporenfreie Teil des Sporangiums verschwand dabei ganz oder doch fast ganz (Fig. 34—39).

Eine ähnliche Erscheinung ist von mehreren Forschern bei dem Bac. amylobacter A. M. et Bredemann beobachtet worden. Der Arbeit von Bredemann (1909, p. 54—57), wo sich nähere Angaben finden, entnehme ich folgendes:

Winogradsky nahm an, daß die Sporenmutterzelle um die Spore herum vollständig mit einer hyalinen Schicht gefüllt sei, welche aufquelle, so die Membran der Mutterzelle an einem Pole sprenge und weit öffne. Die Spore lag in einem abgerundeten dreieckigen Gallertpolsterchen eingebettet, das an zwei Seiten scharfe und an der dritten, der Öffnung, verwaschene Konturen zeigte.

Kentner beobachtete das Abbrechen der sterilen Zellpartie. Bredemann und Haselhoff sahen ein allmähliches Auflösen des Inhaltes und der Membran des sporenfreien Sporangiumteiles.

Auch ich habe aus meinen Kulturen den Eindruck gewonnen, daß ein allmähliches Auflösen des Inhaltes und der Membran der unteren, sporenfreien Sporangienhälfte vor sich geht. Der Sporangienrest umgibt hüllen- oder kapselartig die Spore (Fig. 3, 34—39). Ich bezeichne diese besondere Ausbildung, d. h. die Erhaltung der einen Sporangienhälfte und kapselartige Umbildung, die — wie schon erwähnt — häufig in meinen Kulturen auftrat, auf Veranlassung von Herrn Prof. Meyer mit dem Namen „Hemangium“ (Sporangienhälfte).

Form und Größe des Hemangiums sind verschieden (Fig. 34—39). Wie die Abbildungen (Fig. 38 u. 39) zeigen, gelang es mit der Geißelfärbung auch an den Hemangien Geißeln nachzuweisen.

Mit Methylenblaulösung (1 + 10) und Fuchsinlösung gefärbt, lassen sich keine Differenzierungen des Hemangiums erkennen. In der Wand ließ sich Chitin nachweisen.

Anormale Wuchsformen der Morphoden.

Schwell-Involutionsformen.

Es fanden sich in den verschiedenen Kulturen die merkwürdigsten Schwellformen, so z. B. blasig geschwollene, hefenähnliche, bauchige, kugelige und andere Umgestaltungen (Fig. 42—44). Besonders häufig traten solche Formen in Nährlösung 1 auf, die 2 Proz. Harnstoff enthielt.

Mikroidien.

Unter Mikroidien versteht man nach Prof. A. Meyer (siehe Garbowski 1907; Bredemann 1909, p. 60) kokkenähnliche Oidien, die in Form und Größe von den normalen Oidien erheblich abweichen.

Bredemann (1909) beobachtete Mikroïdienbildung von B. amylobacter.

1. Bei nicht optimaler Ernährung, z. B. in Nährlösungen ohne Zusatz von Kreide, die sonst diesen zur Neutralisierung der gebildeten Säure zugesetzt worden war.

2. Bei nicht optimaler Temperatur, z. B. einer stark nach unten oder oben von der optimalen abweichenden Temperatur.

3. Bei Strichkultivierung, d. h. häufiger Überimpfung des vor der Aussaat nicht erhitzten Keimmaterials.

In den Kulturen von Bacillus probatus konnte ich ebenfalls, wenn auch nur vereinzelt, Mikroidien beobachten; die Ursache ihrer Bildung war auch hier in ungünstigen Verhältnissen, wie starker Schwächung durch ungünstige Ernährung, ungünstige Temperatur und andere schädliche Einflüsse zu suchen. So beobachtete ich einmal in einer 2 Monate alten, wenig alkalischen Bouillonkultur Mikroidien (Fig. 50); ferner wurden sie in geringer Anzahl auf ⅓ D-Agar + 0,1 Proz. Na_2CO_3, der mit 9 Stunden lang auf 80° C erhitztem Sporenmaterial geimpft worden war, gebildet; eine stark geschwächte Kultur, die ausgehend von abgekochtem Sporenmaterial einer kräftigen Kartoffel-Kreidekultur, auf $^1/_5$ D-Agar bei 46° gewachsen war, zeigte ebenfalls neben ganz wenig Stäbchen einige Mikroidien. Zuweilen traten Formen auf, die zweifellos das Anfangsstadium der Mikroidienbildung der Stäbchen waren (Fig. 50).

Versuche, die Mikroidien zu isolieren, um sie getrennt von den Stäbchen auf morphologische und physiologische Eigenschaften zu untersuchen, waren bei Bac. probatus - Material nicht auszuführen, weil, wie schon betont, in meinen Kulturen nur vereinzelt und nur mehr zufällig Mikroidienbildung eintrat; diese unterblieb nahezu ganz, wenn ich häufig auf neuen Nährboden überimpfte und dabei jedesmal von jungem kräftigen, aber nicht vor der Aussaat erhitztem Materiale ausging.

Ich machte daher Versuche mit einem Materiale, das nach Bredemann (1909) regelmäßig bei Strichüberimpfung nicht erhitzter Bakterien Mikroidien bildet.

Das Versuchsmaterial war der Stamm F des Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann. Nahezu täglich wurden junge, kräftig schwärmende Oidien auf neuen D-Agar übertragen und unter optimalen Bedingungen bei 28° C aufbewahrt; es gelang mir jedoch nicht, Mikroidien zu erhalten. Die Kulturen machten nicht einen geschwächten Eindruck, sondern im Gegenteil einen gekräftigten. Die Versuche, Mikroidien zu züchten und zu isolieren, wurden dann abgebrochen.

Nach meinen jetzigen Erfahrungen (siehe auch p. 218 ff.) bin ich überzeugt, daß bei Strichüberimpfung ganz jungen, kräftigen Bakterienmaterials unter Voraussetzung optimaler Kulturbedingungen keine Schwächung, sondern eine Stärkung eintritt. Impft man dagegen älteres, durch Stoffwechselprodukte schon mehr oder weniger stark geschwächtes Material auf neuen Nährboden über — da nicht abgekocht, zum Teil mit den Stoffwechselprodukten —, so können unter Umständen selbst optimale Ernährungsbedingungen nicht ausreichen, die Schwächung der Zellen wieder aufzuheben.

Ursache der Mikroidienbildung in den Bredemannschen Untersuchungen war also danach weniger das Unterlassen der Abkochung, als vielmehr die Überimpfung geschwächten Oidienmaterials.

Degenerations- oder Schwächungsformen.

Bei ungünstigen Kulturbedingungen, z. B. bei maximaler Temperatur, maximalem und minimalem Sauerstoffdruck trat eine starke Schwächung der Bakterien ein. So unterblieb die Sporenbildung, die Stäbchen wurden gewöhnlich länger und vor allem dünner als die unter normalen Verhältnissen beobachteten ausgebildet; in den Stäbchen traten verschiedene mehr oder weniger stark lichtbrechende Kugeln und unregelmäßige Massen auf; einige dieser Kugeln schienen bei tiefer Einstellung etwas heller zu sein als bei hoher, sie färbten sich mit Methylenblaulösung (1 + 10), wurden nach Zugabe von 1 Proz. und 5 Proz. H_2SO_4 wieder entfärbt und waren somit mit unbekannten Stoffen angefüllte Zytoplasma-Vakuolen. Die bei hoher Einstellung stärker lichtbrechenden Kugeln waren wahrscheinlich Fettkugeln (siehe weiter unten). Auf Zusatz von Chloralhydratlösung (5 + 2) verschwand jede Differenzierung des Stäbchenplasmas. Degenerierte Stäbchen, die neben normalen in einer 4 Wochen alten, mit 5 Proz. Pepton und 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat versetzten Bouillon gewachsen waren, wurden auf Fett untersucht.

Zum Fettnachweis wurde die Bouillon mit einer Mischung gleicher Teile Sudan-Alkohol und 1-proz. Natriumkarbonatlösung zusammengebracht und nach längerem Stehen bei bestem Tageslicht untersucht; einige Stäbchen zeigten 1—2 schwach rot gefärbte Kugeln, die vielleicht Fett waren. Diese Beobachtung stimmt mit denen anderer Autoren überein (Näheres siehe Kruse 1911. p. 49).

Weitere Untersuchungen, ob ein Teil der Differenzierungen in geschwächten Stäbchen auf Plasmolyse oder auf das Vorhandensein anormaler, membranloser Sporen zurückzuführen war, wurden nicht ausgeführt.

Reservestoffe.

Von den in Bakterienzellen vorkommenden Reservestoffen: Fett, Iogen, Glykogen und Volutin habe ich bei Anwendung der mikrochemischen Methoden und sonstigen Hilfsmittel (A. Meyer, 1903, I u. II, 1911, 1912) normalerweise nichts nachweisen können.

Kerne.

Mit Methylenblaulösung (1 + 10) konnte ich in Oidien, Fäden und ganz jungen Sporangien blaue Kugeln nachweisen, die auf Zusatz von 1- und 5-proz. Schwefelsäure in allen Fällen sofort entfärbt wurden. (Volutin wird nie sofort entfärbt.) In jungen Oidien, die sich kurz vor der Ausbildung einer Querwand befanden, wurde gewöhnlich eine Kugel in der Mitte des Stäbchens gefunden; war die Querwand eben ausgebildet, so konnte zuweilen je eine seitlich der gebildeten Membran liegende Kugel von nahezu gleicher Größe beobachtet werden. Es ist wahrscheinlich, daß diese Kugeln die Kerne waren (s. Fig. 45 u. 46).

Plasmolyse.

Da es uns hier darauf ankommt, das Eintreten oder Ausbleiben der Plasmolyse als Merkmal für die Speziesdiagnose heranzuziehen, so komme ich etwas eingehender auf die in der Literatur angegebenen Methoden des

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Nachweises zu sprechen. Bezüglich der Literatur über Plasmolyse siehe Fischer, 1891, 1894, 1903; Vahle, 1909 und Kruse, 1911.

Zum Plasmolysennachweis empfiehlt Fischer (1903) die Züchtung der Bakterien auf einem Nährboden, dem er zur Erreichung eines möglichst niedrigen osmotischen Druckes folgende Zusammensetzung gab: 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Rohrzucker, 0,5 Proz. Liebigs Fleischextrakt und Agar-Agar in der gewöhnlichen Konzentration. 20 Stunden altes, auf dem eben alkalischen, kochsalzfreien Nährboden gewachsenes Bakterienmaterial wird zunächst in einen Hängetropfen gebracht, der 0,2-mol = 1,17 Proz. NaCl enthält. Fischer beobachtete bei seinen Versuchen Bakterienspezies, die plasmolysierbar waren und solche, die nicht plasmolysierbar waren. Da der von Fischer angegebene Nährboden jedoch nicht in allen Fällen anwendbar ist, so muß man bei den durch die Züchtung an stärkeren osmotischen Druck gewöhnten Bakterien zum Plasmolysenachweis dann auch Lösungen mit stärkerem osmotischen Druck hinzusetzen. Vahle benutzte zum Plasmolysenachweis Lösungen mit 1, 2, 3, 5 und 10 Proz. Kochsalz, mit 3 Proz. Salpeter und eine von Raciborski (1905) angegebene konzentrierte Lithiumchloridlösung. Bei Anwendung der konzentrierteren osmotischen Lösungen erübrigt sich auch die Züchtung auf dem von Fischer empfohlenen Nährboden.

Der von mir auf Plasmolysierbarkeit untersuchte Bacillus robur A. M. et Neide zeigte selbst bei ganz starken osmotischen Lösungen — es wurden z. B. 10-proz. Salpeter- und 20-proz. NaCl-Lösungen angewandt — keine Plasmolyse. Bacillus robur gehört also demnach wie Bacillus oxalaticus (Vahle, 1909) zu den nicht plasmolysierbaren Bakterien.

Der Harnstoffspalter Bacillus probatus wurde ebenfalls auf Plasmolysierbarkeit untersucht; mit schwachen osmotischen Lösungen z. B. 0,2 mol Kochsalz, wie sie Fischer allerdings nach Vorzüchtung auf besonderem Nährboden zur Differentialdiagnose angewendet wissen will, konnte keine Plasmolyse erzielt werden; diese trat jedoch sehr schön ein, wenn dem in Wasser liegenden, mit einem Deckglas bedeckten Material seitlich ein Tröpfchen 10-proz. NaCl-Lösung zugesetzt wurde; 3 Ränder des Deckglases waren zuvor mit Wachs verschlossen worden. Die Kochsalzlösung diffundierte an der offen gelassenen Stelle in das Material hinein und zwar so langsam, daß alle Übergänge der Plasmolyse-Erscheinung beobachtet werden konnten (s. Fig. 63).

Die Färbung und Fixierung der Plasmolyse gelang mit Methylenblau- und Fuchsinlösung, die Membran konnte auf Zusatz von wenig Jodjodkaliumlösung (stark) deutlicher hervorgehoben werden; wässrige Farbstofflösungen bewirken nach Fischer (1893. p. 150) leicht eine Verquellung des kontrahierten Protoplasten.

Begeißelung.

Zum Nachweis der Begeißelung benutzte ich zuerst die Methode von Löffler (s. Meyer, 1903) und später mit großem Vorteil die von Zettnow angegebene und verbesserte Methode (s. Heim, 1911). Die Zettnowsche Methode erlaubte es mir auch, an die Untersuchung einiger bis jetzt wenig gelöster Fragen, wie Anzahl, Länge und Dicke der Bakteriengeißeln heranzutreten (siehe dazu auch das in A. Meyer, 1911, p. 105—141, Gesagte).

Soll die Geißelfärbung gut gelingen, so sind viele Einzelheiten zu berücksichtigen; bevor ich die Resultate meiner Untersuchungen bringe, gehe ich kurz auf einige dieser Einzelheiten ein.

Zum Geißelnachweis verwendet man nach meinen Erfahrungen am besten das lebhaft schwärmende Oidienmaterial einer etwa 10—20 Stunden alten Kultur; zur Erhöhung der Schwärmfähigkeit empfiehlt es sich, zuvor die Oidien mehrere Male hintereinander alle 24 Stunden in neue Nährböden zu übertragen. Das Bakterienmaterial wird mit Formol fixiert und durch sorgfältiges Auswaschen und Absetzenlassen in Spitzgläschen vom anhaftenden Nährboden befreit. Weniger klar sind die Bilder, die man durch direkten Ausstrich des mit Wasser gemischten und mit Osmiumsäure fixierten Oidienmaterials erhält.

Der Ausstrich gelingt am besten auf schwach angewärmten Deckgläschen (ich legte sie auf den 40° warmen Wärmeapparat), die völlig fettfrei sein müssen und während der ganzen Färbung nur mit der reinen Pinzette anzufassen sind. Es ist zweckmäßig, in Schnecken- oder Schlangenlinien auszustreichen und zwar so schnell und mit so wenig Substanz, daß der Ausstrich sofort nach der Berührung des Deckglases trocknet. Um möglichst feine Ausstriche zu bekommen, wurden Strichversuche mit Federn, Glasstäbchen, Glasröhren, entfetteten Haaren und Platindrähten verschiedener Dicke gemacht. Mit den Haaren und den Platindrähten der Dicke 0,25 mm konnte eine ganz dünne, augenblicklich trocknende Ausstrichfläche erzielt werden; die Platindrähte sind nur für die Ausstriche zu verwenden damit sie glatt bleiben und die Ausstrichflüssigkeit immer gut von ihnen abläuft. Bei der Beizung mit der Tanninbeize fand ich, daß eine 5 Minuten lange Beizung meist ausreichte, daß längere Beizung aber auch keinen Einfluß ausübte auf die Dicke junger Geißeln (s. auch p. 236). Die Versilberung habe ich nicht über der freien Flamme, sondern auf dem 60—70° warmen Wärmeapparat vorgenommen. Eine Verstärkung mit Goldchlorid war in meinen Versuchen nie erforderlich.

Resultate der Geißelfärbungen.

Alle Morphoden mit Ausnahme der freien Sporen sind begeißelt, die Anordnung der Geißeln ist eine peritrische.

Schwärmen der einzelnen Morphoden: Die Keimstäbchen schwärmen sofort nach der Keimung; es gelang bei den noch mit dem Sporenrest behafteten Keimstäbchen durch Färbung gewöhnlich 2—3 Geißeln sichtbar zu machen (Fig. 8, 52); außerdem fand ich in dem 6 Stunden alten, auf Ammon-Agar gewachsenen Materiale ein Keimstäbchen mit 10 Geißeln (Fig. 52); die Geißeln waren bei den 2—3 μ langen Keimstäbchen sehr dünn, gefärbt etwa 0,07—0,08 μ dick, und nicht länger als 3 μ.

Die Oidien zeigen besonders starke Bewegung in jungen, 1—2 Tage altem Zustand; auf festen Nährböden erhält sich die lebhafte Bewegung am längsten im Kondenswasser. Die Anzahl der Geißeln schwankt, wie ich vermute, nach dem Alter der Kultur und, wie ich vermute, nach Art der Fortzüchtung und nach der Stäbchengröße.

Fig. 53 zeigt ein Stäbchen, nach 30½ Stunden aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsen; das Stäbchen ist 3,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 6, die Dicke 0,09—0,1 μ, die Länge durchschnittlich 7 μ (es ist möglich, daß die eine nach der Zeichnung 10 μ messende Geißel keine Einzelgeißel ist).

Fig. 55 zeigt ein Stäbchen von einer 1 Monat alten aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur; das Stäbchen ist 3,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 4, die Dicke 0,11—0,12 μ, die Länge 5 μ.

Fig. 23 zeigt ein Stäbchen einer 24 Stunden alten Strichkultur auf Ammon-Agar; das sehr bewegliche Material war nicht aus Sporen hervorgegangen, sondern durch sehr oftes, meist tägliches Überimpfen auf neuen Nährboden (130 Strichgenerationen) erhalten worden: das Stäbchen ist 10,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 30, die Dicke 0,1 μ, die Länge 7 μ.

Fig. 57 zeigt ein Stäbchen einer 24 Stunden alten, auf Ammon-Agar, wie zuletzt geschildert erhaltenen Strichkultur: das Stäbchen ist 3 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 10, die Dicke 0,1 μ, die Länge 6 μ.

Fig. 33 zeigt ein Stäbchen einer 72 Stunden alten, durch Strichkultur wie oben erhaltenen Ammon-Agarkultur (160 Strichgenerationen): das Stäbchen ist 5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 12, die Dicke 0,1 μ und die Länge 6 μ.

Fig. 54 zeigt ein Sporangium einer 78 Stunden alten aus Sporen auf Ammon-Agar gewachsenen Kultur. Das Sporangium ist 4 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 7, die Dicke 0,1 μ, die Länge 5 μ.

Fig. 56 zeigt ein Sporangium einer 6 Monate alten aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur. Das Sporangium ist 3 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 5, die Dicke 0,14, die Länge 3 μ; es ist mir fraglich, ob die längere Geißel eine Einzelgeißel ist (siehe die Unterbrechungsstelle).

Fig. 33 zeigt ein Sporangium einer 72 Stunden alten, aus sehr oft durch Strichkultur übergeimpftem Stäbchenmaterial (160 Strichgenerationen) hervorgegangenen Kultur. Das Sporangium ist 5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 12, die Dicke 0,1 μ, die Länge 6 μ.

Fig. 38 und 39 zeigen Hemangien einer 1 Monat alten aus Sporen auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur. Die Hemangien sind 2—2,5 μ lang, die Anzahl der Geißeln beträgt 2, die Dicke 0,1—0,13 μ, die Länge 1—2 μ.

Aus den Beobachtungen ergibt sich, daß die Keimstäbchen jedenfalls sehr schnell nach der Keimung Geißeln ausbilden; die Geißeln sind zwar dünn und nicht so lang wie die von späteren Entwicklungsstadien ausgebildeten, ihre Zahl kann sich aber schon der pro 1 μ Stäbchen beobachteten Geißel-Maximalzahl nähern oder gar ihr gleichkommen.

Die Geißel-Maximalzahl pro 1 μ Stäbchengröße berechnet betrug 3 Geißeln und wurde beobachtet bei einem Keimstäbchen und ferner bei Stäbchen, die durch sehr oftes Überimpfen auf neuen Nährboden gekräftigt und, wie das mikroskopische Bild und die größere Geißelzahl zeigte, zu erhöhter Geißelbildung angeregt worden waren. Daß die Geißelbildung durch das eben genannte Kulturverfahren wirklich angeregt werden kann, hat schon Ellis (1902/03) beobachtet.

Die Sporangien können unter den zuletzt genannten optimalen Bedingungen an Zahl der Maximalzahl annähernd entsprechende Geißeln ausbilden.

War eine Kultur durch Alter oder weniger günstige Kulturbedingungen geschwächt, so zeigten die Morphoden auch wenig Geißeln. Um nun entscheiden zu können, ob diese Umstände die Ausbildung einer geringeren Anzahl Geißeln oder andererseits die Abtrennung schon vorhandener Geißeln vom Bakterienkörper bedingen, suchte ich die Morphoden, die am meisten Geißeln zeigten, und genau nach freien Geißelresten. Es stellte sich dabei heraus, daß, wie aus dem früher Erwähnten zum Teil schon bekannt ist, gleich alte, aber unter weniger günstigen Bedingungen gezüchtete Morphoden weniger Geißeln ausbilden, wie unter optimalen Bedingungen gezüchtete. In alten Kulturen zeigen die Morphoden nur wenig erhaltene Geißeln; vom Bakterienkörper abgetrennte Geißelreste findet man aber dort recht häufig.

Die Geißeldicke junger Stäbchen und Sporangien war nahezu konstant

0,1 μ, die der Keimstäbchen betrug nur 0,07—0,08 μ, die alter Stäbchen und alter Sporangien dagegen bis 0,14 μ.

Daß die ersten Entwicklungsstadien zartere Geißeln haben, ist auch von anderen Autoren (s. A. Meyer 1912. p. 130) beobachtet worden. Das Dickerwerden der Geißeln bei monatealten Morphoden führe ich wie Fischer (1895) auf die größere Quellbarkeit alter Geißeln zurück.

Die Durchschnittslänge der Geißeln junger Stäbchen und Sporangien schwankt nur wenig: von 5—7 μ; dabei ist noch zu berücksichtigen, daß die Längenmessungen der Geißeln nicht unbedingt genau sein können, weil man bei peritrich begeißelten Bakterien die Anheftungsstelle, d. h. Durchbruchsstelle der Geißeln nicht genau sieht.

Ich habe bei meinen Messungen angenommen, daß die Spiraldrehung bei dem Antrocknen und Färben aufgehoben wird und somit die beobachteten Windungen als Linie gerechnet.

Die Keimstäbchen haben nur kurze Geißeln, diese sind höchstens 3 μ lang; monatelalte Morphoden haben zuweilen ebenfalls nur ganz kurze Geißeln, das sind jedoch dann immer Geißelreste.

Eine deutliche Beziehung der Geißellänge zur Stäbchenlänge, wie sie Reichert (1909. p. 81, A. Meyer, 1911. p. 124) beobachtet hat, habe ich nicht feststellen können, dagegen stimmen meine Angaben bis zu gewissem Grade mit anderen Beobachtungen (A. Meyer, 1911. p. 130) überein.

Fischer (1893. p. 87) und Migula (1904. p. 75) heben die Ungenauigkeit der Messungen von Geißeldicken hervor wegen ungleich großer Quellung der Geißeln durch Einwirkung von Beize bei Vornahme der Färbung. Ich habe jedoch bei jungem, kräftig schwärmendem Stäbchenmaterial eine durch Beize hervorgerufene Quellung der Geißeln nicht feststellen können, obwohl in einzelnen Versuchen die angewendete Zettnowsche Beize verschieden lange Zeit bis über eine Stunde eingewirkt hatte. Die Geißeldicke blieb konstant 0,1 μ.

Um festzustellen, ob die Abtrennung der Geißeln vom Bakterienkörper durch Abwerfen (Fischer, 1895) oder Abreißen (Reichert, 1909. p. 42, A. Meyer, 1911. p. 132) erfolgt, habe ich die Einwirkung verschiedener äußerer Einflüsse auf die Schwärmfähigkeit der Bakterien und auf die Erhaltung ihres Geißelbelages untersucht.

1. Einfluß höherer Temperatur.

a) Eine 2 Tage alte auf Ammon-Agar gewachsene Strichkultur wurde 2 Stunden bei 60° C in den Brutschrank gestellt und das Material darauf zur Geißelfärbung benutzt. Die Geißeln waren, wie Fig. 58 zeigt, nicht abgeworfen worden.

b) Das feucht ausgestrichene und in reichlich Flüssigkeit liegende, geißeltragende Bakterienmaterial einer jungen Ammon-Agarkultur wurde auf 80° warmem Wärmeapparat erwärmt und zeigte ebenfalls nach der Geißelfärbung keinen Verlust des Geißelbehanges.

2. Einfluß plasmolysierender Lösungen.

Bei Zusatz von 3-proz. Kochsalzlösung zu dem schwärmenden Stäbchenmaterial trat neben der Plasmolyse auch Unbeweglichkeit ein; nach dem Entfernen der Kochsalzlösung trat die Beweglichkeit der Stäbchen wieder ein; die Geißeln waren also erhalten geblieben und nicht abgeworfen.

3. Einfluß der Präparierung.

Reichert (1909) beobachtete, daß Bewegung von flüssigen Kulturen auf das Abreißen von Geißeln einen viel geringeren Einfluß ausübte als die Verdunstungsströmung, die beim Austrocknen der Flüssigkeitstropfen einer Schwärmerkultur eintrat.

Diese Beobachtung Reicherts kann ich insofern bestätigen, als ich bei den Geißelfärbungen von eingetrockneten Flüssigkeitströpfchen und Ausstrichen an deren Rande, wo also die größte Verdunstungsströmung geherrscht hatte, die Bakterienzellen gewöhnlich geißelarm oder gar geißelfrei fand; die abgerissenen Geißeln lagen dabei meist in der Strömungsrichtung.

Gramdauer.

Bei Ausführung der Gramdauerbestimmung habe ich mich genau an die Vorschrift von Neide (1903) gehalten. Bevor ich zu den Versuchen mit Bac. probatus überging, habe ich zuerst nochmals die Angaben für die Gramdauer von Bac. robur nachgeprüft und kann danach die Brauchbarkeit der Methode für speziesdiagnostische Zwecke bestätigen.

Zur Bestimmung der Gramdauer von Bac. probatus verwendete ich Stäbchen einer 3 Tage alten, bei 28° auf Ammon-Agar gewachsenen Kultur; die Stäbchen befanden sich gerade vor der Sporenbildung, zeigten aber zum größten Teile noch keine Sporenanlagen. Alle 5 Minuten wurde der Grad der Entfärbung in Alkohol betrachtet: Dabei ergab es sich, daß nach 30 Minuten langem Verweilen in 28° warmem 80-proz. Alkohol die nach Gram gefärbten Stäbchen völlig entfärbt waren, während sie nach 20 Minuten langem Verweilen darin den Farbenton des Testobjektes „Bac. tumescens“ zeigten. Die Gramdauer für Bacillus probatus beträgt also 20 Minuten.

Giemsafärbung.

Die Färbungsversuche wurden im Anschluß an die Versuche mit Bac. sphaericus (siehe A. Meyer, 1911. p. 61—62) auch mit 3 Tage altem, auf Ammon-Agar bei 28° gewachsenen Stäbchenmaterial von Bac. probatus vorgenommen. Eine Öse Bakterienmaterial wurde mit gleichviel 1proz. Osmiumsäure gemischt, auf einem fettfreien Deckglase ausgestrichen, bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet, 10 Minuten in absoluten Alkohol gehängt und nach dem Abtrocknen mit Fließpapier gefärbt.

Zur Giemsa-Färbung wurde nach Angabe von Abel (1910. p. 104) eine Mischung von 10 ccm 30—40° warmen, völlig säurefreien destillierten Wassers und 10 Tropfen Giemsa-Lösung (Grübler, Leipzig) benutzt. Diese Mischung wurde in Glasschälchen auf den Ausstrich gegossen und nach 5 Minuten langem Einwirken durch neue warme Farblösung ersetzt, die gleichfalls 5 Minuten einwirkte. Nach dem Abspülen mit Wasser, darauffolgendem Absaugen mit Fließpapier und Trocknen wurde das Präparat in Kanadabalsam oder in Wasser gelegt.

Die Beobachtungen wurden vorgenommen bei Auerlicht mit $^1/_{12}$ Ölimmersion und Apochromat 2 mm, Apertur 1,30 (beide Linsen von Zeiß).

1. Untersuchung des bei 35° gefärbten, in Wasser liegenden Präparates.

Das Zytoplasma der Stäbchen war rot, rotviolett oder blauviolett gefärbt. Bei hoher Einstellung sah man bläulich gefärbte Körner in verschiedener Anzahl und verschiedener Größe. Bei mittlerer Einstellung verschwanden die Körner, die demnach nur äußerlich an der Membran angeklebt waren; dafür traten meist 2—3 tiefblaue, zuweilen auch deutlich blaurote Körner gleicher Größe auf (s. Fig. 47), die auf Zusatz 1proz. Schwefelsäure sofort entfärbt wurden; vermutlich waren es Kerne.

2. Untersuchung des bei 40° gefärbten, in Kanadabalsam liegenden Präparates.

3. Untersuchung des bei 30° gefärbten, in Kanadabalsam liegenden Präparates.

Die Untersuchung 3 ergab eine etwas schwächere Färbung als die Untersuchung 2; beide in Kanadabalsam gelegten Präparate zeigten dieselbe Erscheinung als das in Wasser liegende Präparat, nur waren alle Farbtöne durch die Aufhellungskraft des Kanadabalsams weniger tief.

Da die Färbung die schon bekannten Einschlüsse der Bakterienzelle nicht deutlicher zeigt, als andere, weit einfacher zu handhabende Farblösungen, dabei noch leicht zu Täuschungen Anlaß geben kann, so scheint ihre weitere Anwendung nicht empfehlenswert.

Chitin. Nachweis und Vorkommen.

(Siehe auch A. Viehoever, 1912. p. 443—458.)

Nachweis: Das Chitin wurde mit der van Wisselinghschen Reaktion nachgewiesen. Zur Ausführung dieser Reaktion wurden mehrere Ösen kräftig entwickelten Bakterienmaterials in kleine, mit etwa 1 ccm 50proz. Ätzkalilösung beschickte Glasröhrchen gebracht und die Gläschen dann zugeschmolzen. Da in der Literatur eine Angabe über die erforderliche Dauer der Erwärmung für Bakterien nicht zu finden war, wurden Versuche bei 15, 60 und 90 Minuten langer Einwirkung von 6 Atmosphären im Autoklaven angestellt. Das Ergebnis war, daß eine 15 Minuten lange Erhitzung im Autoklaven bei 6 Atmosphären Druck = 164° C für Bac. probatus und Sporodinia, das als Testobjekt diente, völlig ausreichte, um das Chitin in Chitosan zu verwandeln; vermutlich genügt diese Dauer auch für die anderen Bakterienspezies. Die kurze Erwärmung hatte noch den Vorteil, daß die weniger widerstandsfähigen Morphoden zum Teil erhalten blieben. Nachdem das im Autoklaven erhitzte Material erkaltet war, wurden die Gläschen geöffnet und ihr Inhalt auf Uhrschälchen ausgeleert. Nach dem Absetzen des Rückstandes wurde die überstehende Flüssigkeit mit der Pipette weggenommen, der Bakterienrest dann in ähnlicher Weise nacheinander mit 75-, 50- und 25-proz. Glyzerin — nach der Angabe von Garbowski (1907) — sorgfältig ausgewaschen; hierauf auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglase bedeckt, das an zwei Seiten mit Wachsstreifen auf dem Objektträger befestigt wurde.

Dann ließ ich im Überschuß durch Absaugen mit Fließpapier Jodjodkaliumlösung (2 g Jod, 1 g Jodkalium und 200 ccm Wasser) zu dem Präparate fließen und verdrängte diese dann wieder in gleicher Weise völlig durch überschüssigen Zusatz von 1proz. Schwefelsäure.

Versuchsmaterial.

Als Versuchsmaterial wurde zuerst eine 8 Tage alte und eine 13 Monate alte, auf Ammon-Agar gewachsene Kultur von Bac. probatus benutzt.

Es gelang mir, mit der oben erwähnten Methode das Chitin in den Membranen aller Morphoden dieser Spezies: in Oidien, Sporangien, Hemangien (Sporen umschließende Sporangienhälften) und Sporen, auch in leeren Sporen- und Sporangienmembranen, einwandfrei nachzuweisen.

Die Chitosan- oder Mykosinreaktion wurde meist erst sichtbar, sobald das Jod durch die Schwefelsäure verdrängt worden war. Die Färbung ist nicht immer sehr deutlich zu sehen, der Farbenton ist nicht immer rein violett; in ein und demselben Präparate kann man z. B. neben deutlich violett gefärbten Gebilden solche mit schwarz-violetter, rotvioletter, braunvioletter und dunkelrotbrauner Farbe beobachten; ja einige können auch braun oder ganz farblos sein.

Eine schwache gelbliche bis bräunliche Färbung zeigen auf Zusatz der oben erwähnten Jodjodkaliumlösung die Bakterienreste dann, wenn sie noch unzersetztes Chitin enthalten, also besonders vor der Erhitzung mit Kalilauge.

Auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure schlug diese gelbliche bis bräunliche Färbung nie in eine violette um, sondern verschwand vollständig; ein Beweis dafür, daß nur das in Chitosan umgewandelte und nicht auch das unzersetzte Chitin die van Wisselinghsche Reaktion zeigt.

Als Vergleichsobjekt dienten beim Chitinnachweis Flügeldecken eines Käfers, ferner Pilzhyphen von Aspergillus glaucus und Sporodinia grandis Linck. Besonders gut eignen sich die plasmafreien Sporangienträger von Sporodinia, da sie gegen die Einwirkung der Kalilauge sehr widerstandsfähig sind und sehr deutliche Färbungen mit dem van Wisselinghschen Reagens geben.

Die Beobachtungen wurden vorgenommen mit Zeißscher Optik: Kompensationsokular 12 und 18, Ölimmersion 1/12 und Apochromatlinse (Apertur 1,40, Brennweite 2 mm).

Die Färbungen waren am besten bei Tageslicht (weißem Wolkenlicht) zu sehen; bei Verwendung der A. Meyerschen Mikroskopierlampe (Gasglühlicht) waren die Farbentöne ebenfalls zu sehen, hatten dann aber mehr einen Stich ins Rötliche.

Ich versuchte nun auch, die Kalilauge in der Kälte anstatt in der Hitze auf das Bakterienmaterial einwirken zu lassen, in der Annahme, daß dadurch die Struktur der Bakterien besser erhalten bleiben müsse und folglich auch der Nachweis des Chitins sich leichter gestalten müsse. Ich habe Oidien- und Sporenmaterial von Bac. asterosporus in kleinen Gläschen mit 50proz. Kalilauge zusammengebracht und nach 8 Tagen beobachtet: die Morphoden waren wohl zum Teil verändert — geschrumpft oder gequollen — aber im ganzen doch noch gut und deutlich zu erkennen. Nach Zusatz des van Wisselinghschen Reagens war nur ganz vereinzelt eine schwache violette Färbung zu sehen, der Umwandlungsprozeß war also nach achttägigem Stehen bei durchschnittlich 20° C noch nicht weit fortgeschritten. Das Bakterienmaterial blieb dann noch länger mit der Kalilauge in Berührung und wurde nach 1½ und nach 3 Monate langem Stehen bei ca. 20° nochmals untersucht: Während die van Wisselinghsche Reaktion nach 1½ Monaten bei den meisten Zellen noch nicht deutlich zu sehen war, schien der Umwandlungsprozeß des Chitins in Chitosan nach 3 Monaten vollendet, wenigstens trat eine sehr schöne und deutliche Färbung auf Zusatz des Reagens ein. Die Zerstörung der Zellen war hier nicht so groß, wenigstens waren die Sporen besser und in größerer Anzahl erhalten als in dem mit der Kalilauge erhitzten Bakterienmateriale.

Es wird sich also für die Fälle, in denen es nicht auf eine schnelle Entscheidung ankommt, immerhin empfehlen, das auf Chitin zu untersuchende Material auch in ähnlicher Weise monatelang bei Zimmertemperatur mit

50proz. Kalilauge in Berührung zu lassen. Bei ganz empfindlichen Objekten könnte man ja auch schwächere Kalilauge nehmen, müßte dann allerdings das Material wieder länger mit ihr in Berührung lassen.

Untersuchungen der Morphoden im Ultramikroskop.

(bezl. der Apparate und näherer Angaben siehe A. Meyer, 1911. p. 76—79.)

Meine Untersuchungen der Morphoden von B. probatus im Ultramikroskop bestätigten die allgemeinen Angaben von A. Meyer (1911): Ich hebe nur hervor, daß weder Kerne noch Einzelgeißeln zu sehen waren. Die Oidien zeigten innerhalb der hell leuchtenden Membran ein durchaus optisch leeres Zytoplasma; nur bei den degenerierten Stäbchen fanden sich helleuchtende Tröpfchen, die den früher beschriebenen entsprechen. Die in kräftigem Schwärmzustand mit Reichertscher Beize (Reichert, 1909) gefärbten Zellen zeigten nur ganz vereinzelt rotbraun gefärbte Geißeln oder Geißelreste.

Gewinnung einer Einzellkultur.

Übersicht über die Isolierungsmethoden.

Weder beim Kochschen Plattenverfahren, noch bei der von Hansen angegebenen fraktionierten Aussaatmethode kann man, da die mikroskopische Kontrolle fehlt, sicher sein, daß jede einzelne Kolonie nur aus einem Keim und nicht aus mehreren Keimen der gleichen Art hervorgegangen ist.

In der Literatur (siehe auch Burri, 1909. p. 3—6) sind nun drei Verfahren angegeben, die die Isolierung einer einzelnen Bakterienzelle bei gleichzeitiger mikroskopischer Kontrolle ermöglichen sollen:

1. Die Tröpfchenmethode von Lindner (1905 und 1908).

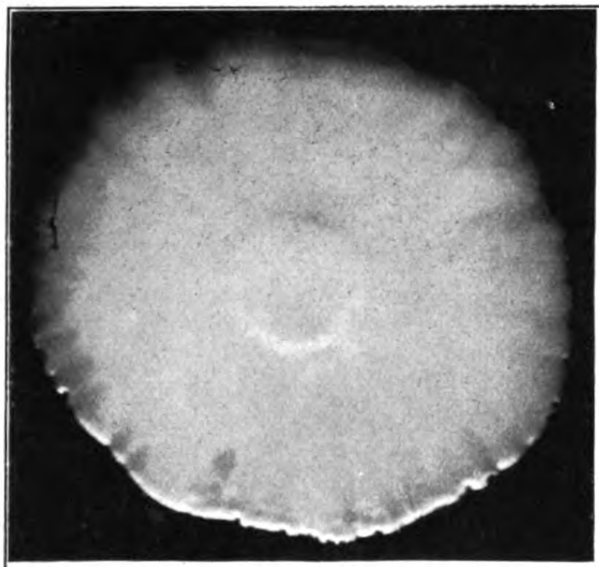
Prinzip: Mit einer Zeichenfeder werden auf ein Deckglas kleinste Tröpfchen einer Kulturflüssigkeit aufgetragen, in der die zu isolierenden Bakterien in geeigneter Weise verteilt sind. Die Deckgläschen werden, wie es auch bei der Herstellung und Untersuchung hängender Tropfen geschieht, mit dem Tröpfchen nach unten auf einen hohlen Objektträger gelegt und durch Vaselindichtung vor Verdunstung geschützt. Diejenigen Tröpfchen, die bei der mikroskopischen Kontrolle nur einen Keim enthalten, werden markiert und weiter beobachtet.

Diese Methode, die sich für die Isolierung von Hefezellen und Pilzsporen bewährt hat, nach Lindner (1908) auch für die Einzellisolierung größerer Milchsäurebakterien brauchbar ist, reicht jedoch für die Isolierung der meisten Bakterien nicht aus (siehe auch Burri, 1909): die verhältnismäßig schwach lichtbrechenden Keime heben sich zu wenig deutlich von dem hellen Grunde ab und werden ferner meist durch die am Grunde des Tröpfchens auftretenden Interferenzstreifen nahezu oder ganz unsichtbar gemacht.

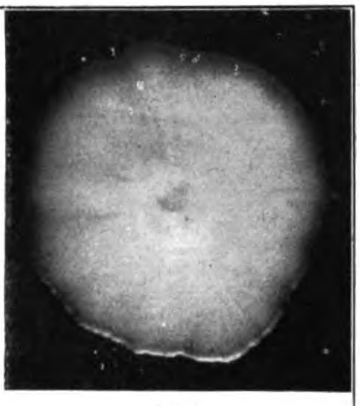
2. Shouten (1899, 1901, 1905, 1911) empfiehlt einen Isolierapparat (Abbildung und Beschreibung siehe 1905, sowie in Küster, 1907), der es unter gleichzeitiger mikroskopischer Kontrolle ermöglichen soll, ein nur einen Keim enthaltendes Tröpfchen vermittels feiner Glasnadeln aus einer mit keimhaltiger Flüssigkeit gefüllten feuchten Kammer herauszunehmen und in keimfreie Nährflüssigkeit zu übertragen.

Der Apparat ist recht kostspielig (Preis 100 Mark), die Methode — wie auch Burri (1909) hervorhebt — sehr umständlich und aller Wahrscheinlichkeit nach nicht unbedingt zuverlässig.

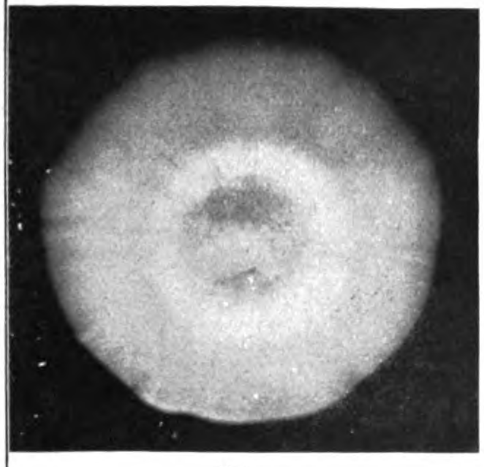
Centralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. 39. ***Edwards,*** *Cheddar Cheese. Plate III.*



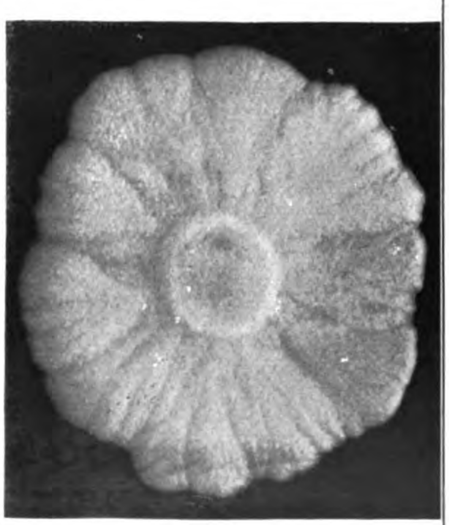
J.2.



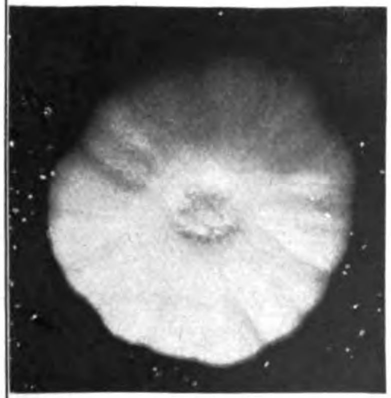
K.3.



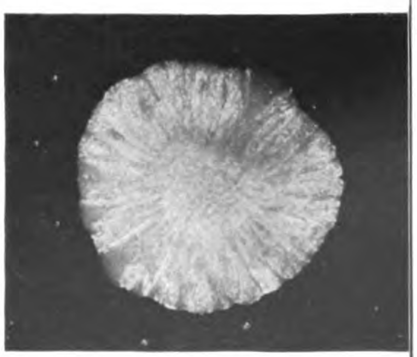
K.1.



O.1.



P.1.



X.2.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

3. Das Tuscheverfahren nach Burri (1909).

Prinzip: Feinste Tröpfchen einer geeigneten Keimtuschemischung werden mit einer Feder auf Gelatineboden aufgetragen, mit einem Deckglase bedeckt und mikroskopisch durchgemustert. Diejenigen Tuschetröpfchen oder Punkte, die nur eine Zelle enthalten, werden entweder auf der Gelatine weiter gezüchtet oder mit dem Deckglase, an dem sie haften bleiben, in einen für die Weiterzucht der isolierten Zelle geeigneteren Nährboden übertragen. Da die hellen Keime sich von dem dunklen Tuschegrund deutlich abheben, so läßt sich ihre Anzahl im Tuschepunkt mit Sicherheit feststellen; es bedarf nur einigen Geschickes und einiger Übung, um mit dieser einfachen Methode zum Ziele zu kommen.

Auf Grund zahlreicher Versuche empfehle ich nun folgende, von Burris Angaben zum Teil etwas abweichende Ausführung dieser Tuschemethode:

Beschaffenheit der Tusche und Vorbereitung der Tuscheverdünnung.

Als Tusche verwende man nur die Pelikantusche No. 541 der Firma Günther, Hannover (zu beziehen von Grübler, Leipzig); man verdünne 1 Teil mit 9 Teilen destilliertem Wasser und fülle je 5—10 ccm dieser Mischung in Reagensröhrchen, die nach der Sterilisation verschlossen und wenigstens 8—14 Tage zum Absetzen der in der Tusche meist vorhandenen Fremdteilchen beiseite gestellt werden. Zur Vermeidung von Infektion sowie von Verdunstung der Tuschemischung ist es zweckmäßig, die Wattepfropfen der Reagensgläschen mit Salizylspiritus (1 g Salizylsäure + 100 ccm Alkohol absolutus) zu tränken, die Wattepfropfen dann etwas in die Röhrchen hineinzuschieben und schließlich noch einen sterilen Korkstopfen aufzusetzen.

Herstellung der Bakterientuschemischung.

Bei Bedarf füllt man etwa je ½ ccm dieser sterilen Tuscheverdünnung in kleine sterile Reagensgläschen (ca. 6 cm lang, 0,6 cm Durchmesser). In dem ersten Gläschen verreibt man eine Spur des Bakterienmaterials, überträgt eine Öse dieser Mischung in das zweite Gläschen und so fort nach der Kochschen Verdünnungsmethode. Recht zweckmäßig ist es auch, in dem kleinsten Tuschepunkt etwa der zweiten Verdünnung die Anzahl der Bakterien festzustellen und dann noch soviel sterile Tusche zu der Verdünnung hinzuzusetzen, daß nach dem Umschütteln in einem Tuschepunkt gleicher Größe nur eine Zelle vorhanden sein kann; sind z. B. in einem Tuschepunkt der gewünschten Größe 4 Zellen gefunden worden, so gibt man noch 3 Teile Tusche zur Verdünnung hinzu. Ein Austrocknen der Keimtuschemischung läßt sich leicht durch Verschließen des Gläschens verhindern, die Mischung also so beliebig lange aufbewahren.

Anders ist es bei der Anordnung von Burri (1909), der die Herstellung der Bakterientuschemischung und -Verdünnung auf einem Objektträger vornehmen läßt. Burri will die Bakterien möglichst kurze Zeit nur mit der Tusche in Berührung lassen, da er Schädigungen der Zellen durch die Tusche befürchtet; er hält nun die Art der Tuscheverdünnung auf dem Objektträger für die schnellste: in mehrere größere, nebeneinander liegende Tuschetropfen überträgt er der Reihe nach immer kleinere Mengen des Keimmaterials, indem er Spuren des ersten Tropfens, gemischt mit Keimmaterial, in den zweiten überträgt und nach dem Verrühren Spuren des zweiten Tropfens in den dritten usw. Burri muß aber dabei mit dem Nachteil rechnen, daß die Tuschetropfen in ganz kurzer Zeit austrocknen und die Keimverdünnungen dann immer wieder von neuem herzustellen sind, wenn sich bei der mikroskopischen Kontrolle eine Unbrauchbarkeit der Keimtuschemischung ergeben hatte.

Ich habe zur Feststellung einer schädlichen Wirkung der Tusche auf Bakterienzellen sporenbildende und nicht sporenbildende Formen längere Zeit mit der (1 + 9) verdünnten Pelikantusche in Berührung gelassen, aber in keinem einzigen Falle eine bemerkenswerte Schädigung der mit Tusche vermischten Bakterien beobachten können:

Bakterienspezies	Entwicklungszustand	Berührungsdauer mit Tusche	Übergeimpft auf günstigen Nährboden
Bacillus robur A. M. et Neide	4 Wochen alte Sporen	2 Tage	kräftige Entwicklung
Bacillus tumescens Zopf	4 „ „ „	2 „	„ „
„ „ „	4 „ „ „	4 Wochen	„ „
„ „ „	2 Tage alte Oidien	2 Tage	„ „
„ probatus A. M. et Viehoever	2 „ „ „	2 „	„ „
„ probatus A. M. et Viehoever	8 Wochen alte Sporen	3 Wochen	„ „
Pseudomonas Olivae A. M. et Meyer	4 Wochen alte Oidien	4 Tage	„ „

Es wäre ferner noch zu erwähnen, daß die in die Tusche eingeimpften 8 Wochen alten Sporen von Bacillus probatus vereinzelt schon in der Tusche zur Keimung kamen.

Bei diesen Versuchen ist allerdings nur die Wirkung der Tusche auf eine verhältnismäßig große Anzahl Keime und nicht die auf jeden einzelnen Keim ausgeübte berücksichtigt worden. Immerhin geht aus diesen, wie auch aus meinen Isolierungsversuchen hervor, daß von einer wesentlichen Schwächung der Bakterien durch Pelikantusche nicht die Rede sein kann; zudem wird man wohl bei der Herstellung von Einzellkulturen nie in die Lage kommen, Bakterien isolieren zu müssen, die tage- oder gar wochenlang in Tusche gelegen haben.

Auswahl des Isolierungsbodens.

Der beste Isolierungsboden ist Gelatine (siehe auch Burri, 1909), deren Konzentration jedoch von größter Bedeutung für das Gelingen kleinster Tuschepunkte ist. Bei 18° C nicht übersteigender Temperatur ist eine 10-proz. Gelatine noch brauchbar, bei höherer Zimmertemperatur wird man zweckmäßiger eine konzentriertere Gelatine verwenden; eine weiche Gelatine wird beim Aufsetzen der Feder fast regelmäßig verletzt.

Die Verwendung von Agar-Agar ist nicht zweckmäßig (siehe auch die übereinstimmenden Angaben von Burri, 1909), da Versuche mit ausgetrocknetem 1-, 2- und 3-proz. Agar folgende Resultate ergaben: Die Tuschetropfen lassen sich zwar gut auf der Agaroberfläche absetzen, aber, da sie meist in den Agar eindringen, nicht mehr wie bei der Gelatine unversehrt mit einem Deckgläschen abheben. Bei Agar treten die einzelnen Tuscheteilchen zudem so stark hervor, daß ein darauf oder dazwischen liegender Bakterienkeim nur sehr schwer zu sehen ist.

Herstellung der Tuschepunkte.

Nach zahlreichen Versuchen mit spitzen und stumpfen Zeichenfedern, Schreibfedern, feinen Glaskapillaren und dünnen, am Ende abgerundeten Glasfäden, empfehle ich nicht zu spitze Zeichenfedern zur Herstellung von Tuschepunkten. Ich benutzte schließlich nur die Goldfeder eines Füllfederhalters, die mit einer Iridiumspitze versehen war; eine Goldfeder wird zudem nicht abgegriffen, läßt sich leicht reinigen und keimfrei machen. Man wähle eine auf der Unterseite schwach kugelig verdickte Feder, da bei sehr spitzen Federn schon bei leichtester Berührung der Gelatineoberfläche die Gelatine verletzt wird, der Tuschepunkt zerfließt und unbrauchbar wird. Die sterile Feder tauche man etwa 2—3 mm tief in die Bakterientuschemischung und setze sie dann ganz vorsichtig wippend nahezu horizontal auf die Gelatineoberfläche auf; man kann auch — wie es Burri (l. c.) angibt — vorsichtig stechende Bewegungen mit der Feder ausführen, wird aber dabei — nach meinen Erfahrungen — sehr oft in die Gelatine stoßen.

Punktierung.

Die Tuschepunkte bringe man am besten in regelmäßigen Abständen auf die Gelatineschicht und lege, um die Punkte wieder leicht aufzufinden, bei der Ausführung der Punktierung unter die Gelatineplatte einen weißen Karton, auf dem die gewünschte Anordnung der Punktierung markiert ist. Die Tuschepunkte werden dann sofort mit Glassplittern oder mit 3—4 mm großen Deckgläschen bedeckt, die zuvor (zweckmäßigerweise zu mehreren im Heißluftschrank) zu sterilisieren sind.

Bei der Ausführung kann man mit Vorteil die neue binokulare Lupe von Zeiß benutzen. Zum Anfassen der kleinen Deckgläschen eignen sich sehr gut die Kühnschen Pinzetten.

Untersuchung der Tuschepunkte.

Die Petri-Schale mit Gelatine lege man nach dem Aufsetzen der Tuschepunkte ohne Deckel auf den Objekttisch des Mikroskops, suche jeden Punkt zuerst bei schwacher Vergrößerung auf, bringe ihn mit Hilfe des Fadenkreuzokulars in die Mitte des optischen Feldes und sehe mit einem starken Trockensystem (z. B. mit Objektiv E und Kompensationsokular 12 von Zeiß) nach, ob der Tuschepunkt nicht zu groß und die Verdünnung die richtige, d. h. nur eine Zelle in ihm vorhanden ist. Der Tuschepunkt soll an Größe das Gesichtsfeld des genannten optischen Systems nicht überschreiten, eine Forderung, die man nach einiger Übung wohl erfüllen kann.

Weiterzüchtung des isolierten Keimes.

1. Sind Bakterien zu isolieren, die unter den angegebenen Verhältnissen auf Nährgelatine wachsen, ohne diese schnell zu verflüssigen, so markiere man etwa mit steriler Tusche oder Farblösung auf dem Deckgläschen die Tuschepunkte, die bei der mikroskopischen Kontrolle nur einen Keim enthalten; die Gelatineschale stelle man dann bedeckt und vor Luftkeimen gesichert beiseite, beobachtet zuweilen die Vermehrung der isolierten Zelle und impfe schließlich von der daraus entstandenen Kolonie auf sterilen Nährboden über.

2. Einzelzellen von Bakterien, die nicht auf Gelatine wachsen oder diese sehr schnell verflüssigen, müssen in andere Kulturbedingungen über-

tragen werden: Den Tuschepunkt, der nur einen Keim aufweist, hebe man mit dem Deckglase, an dem ja — wie oben schon gesagt — der Tuschepunkt hängen bleibt, möglichst steril ab und übertrage ihn in solche Nährbedingungen, die für das Wachstum der betreffenden Zelle am günstigsten sind. Sehr zweckmäßig ist es jedoch auch, zur Weiterzüchtung Elektivnährböden zu nehmen (z. B. harnstoffhaltige Nährböden bei Harnstoffbakterien), um so eine Vermehrung eventuell vorhandener fremder Luftkeime in der Einzellkultur zu verhindern.

Zur Abhaltung der senkrecht herunterfallenden Luftkeime empfiehlt es sich, vor Beginn der Isolierung in geringer Höhe eine über das Mikroskop und einen Teil des Arbeitsplatzes reichende, horizontal an Stativen befestigte Glas- oder Metallplatte anzubringen.

Es ist immer zu raten, mehrere Isolierungen vorzunehmen, da die isolierte Zelle ja geschwächt oder gar tot sein kann; eine vergleichende Beobachtung der wichtigsten morphologischen und physiologischen Merkmale des durch Isolierung einer Zelle gewonnenen Stammes mit dem auf andere Weise gewonnenen Stamme ist am Ende natürlich unerläßlich.

Eigenschaften des aus einer einzelnen Spore hervorgegangenen Stammes von Bacillus probatus.

Zur Erzielung der Einzellkultur ging ich von abgekochtem Sporenmaterial der 30. Kulturgeneration aus, die auf Ammon-Agar gewachsen war. Die nach dem oben beschriebenen Tuscheverfahren isolierte Spore brachte ich in 2 Proz. Harnstoffbouillon zur Entwicklung und impfte die entstandenen Oidien auf Ammon-Agar über. Die Harnstoffspaltung in der Harnstoffbouillon, die typische Sporenbildung auf Ammon-Agar waren der Beweis, daß die Isolierung gelungen war.

Dieser Stamm wurde nun auch mindestens 4 Wochen nahezu täglich auf Ammon-Agar, $\frac{1}{3}$ D-Agar + 2 Proz. oder 0,2 Proz. Harnstoff übergeimpft und bei 28° C gezüchtet. Die morphologischen wie physiologischen Eigenschaften waren dieselben, auch bezüglich der Schwankungen, wie die bei dem nach der Plattenkulturmethode isolierten Hauptstamme beobachteten und beschriebenen.

Sporengröße einer 4 Wochen lang auf Ammon-Agar fortgezüchteten Kultur:

	Längliche Sporen						Kugelige Sporen				
Länge	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0		0,6	0,7	0,8	0,9	1.0
Breite	0,5	0,6	0,5	0,7	0,8	Stück	1	9	64	8	3
Stück	1	4	1	2	7						

Die Intensität der Harnstoffspaltung (siehe **Tab. X.** p. 306) verhielt sich ebenfalls der bei dem Hauptstamme beobachteten gleich.

Kapitel 3.

Kulturelle Eigenschaften. Verwertbarkeit von Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen.

Kulturelle Eigenschaften.

Wachstum auf Agar-Nährböden.

Im Abschnitte über die Auswahl der für die Entwicklung und Sporenbildung günstigsten Nährböden (siehe p. 214) habe ich schon die wichtigsten Resultate meiner Kulturversuche mitgeteilt. Ich erwähne hier nur die auf-

fälligsten Wachstumserscheinungen und den Entwicklungsgang von Spore zu Spore auf Nährböden, die für die Kultur und Speziesdiagnose des Harnstoffspalters von Wert sind.

Resultate der Entwicklung.

1. D-Agar neutral. Geimpft mit Sporen und mit Oidien, die auf Harnstoff-Mineral-agar gewachsen waren.

Auf dem neutralen Nährboden fand trotz wiederholten Überimpfens kein Wachstum statt.

2. D-Agar + 0,25 Proz. Na_2CO_3. Geimpft mit Sporen von Harnstoff-Mineral-Agar.

Das Sporenmaterial wurde ½ Minute im Wasserbad bei 100° erhitzt, die Kulturen bei 28° C gezüchtet.

Am 4. 12. geimpft.
„ 7. 12. beobachtet: noch keine makroskopische Entwicklung.
„ 8. 12. „ „ „ „ „
„ 9. 12. „ „ „ „ „
„ 10. 12. „ schwache makroskopische „
„ 11. 12. „ punkt- oder körnchenförmige Entwicklung; Kolonie rund, tröpfchen-milchglasähnlich, durchscheinend mit Opaleszenz.
„ 16. 12. „ am Grunde der schiefen Agaroberfläche zusammenhängender, grau bis gelblichweißer, opalisierend durchscheinender, dünner Belag.
Mikroskopisch: Oidien, z. T. mit körnigem Inhalt (geschwächter Zustand), ganz vereinzelt Sporangien mit Sporen.

Nach mehreren Abimpfungen gingen die Kulturen ganz ein.

3. D-Agar + 1 Proz. $CaCO_3$. Strichüberimpfung von Oidienmaterial (auf Harnstoff-Mineral-Agar gewachsen).

Innerhalb 14 Tagen war nur eine ganz schwache Entwicklung eingetreten.

4. Harnstoff-Mineral-Agar. Impfung wie bei Versuch 2.

Nach 5½—6 Stunden Keimung.
„ 70 „ Makroskopisch: schwach wolkige, dünne, weißliche Beläge.
Mikroskopisch: Schwärmer und Sporenanlagen.
„ 83 „ Makroskopisch: der Belag ist etwas kräftiger.
Mikroskopisch: Schwärmer, junge Sporangien und ein reifes Sporangium, d. h. eins mit stark lichtbrechender Spore.

Plattenkolonien von Harnstoff-Mineral-Agar, beobachtet am 4. Tage nach der Impfung mit abgekochten Sporen: Bis 2 mm große Kolonien; diese mit einem undurchsichtigen, weißlichgrauen Kern und einem weißlich-gelblichgrauen, opalisierend durchscheinenden Kranz. Die Kolonien rochen stark nach Ammoniak.

5. ⅓ D-Agar + 0,1 Proz. Natriumkarbonat + 2 Proz. Harnstoff, geimpft mit normal vorbehandeltem, d. h. 4 Wochen auf Ammon-Agar fortgezüchtetem Sporenmateriale, das vor der Impfung noch ½ Minute im 100° heißen Wasserbade erwärmt worden war.

Keimung, Wachstum und Sporenbildung waren etwas verzögert und geschwächt, die Stäbchen z. T. etwas dünner und länger wie gewöhnlich: Kristallbildung war nach 24—28 Stunden zu beobachten, nach dieser Zeit war gewöhnlich auch die Agaroberfläche bei der Durchsicht schwach wolkig getrübt, ein deutlicher Belag jedoch selbst nach längerer Zeit kaum zu sehen.

Durch nahezu tägliches Überimpfen der kräftigen Schwärmoidien in frisch hergestelltem Harnstoff-Agar gelang es jedoch, wie auch an anderer Stelle hervorgehoben ist, Generationen auf diesem Nährboden fortzupflanzen und zur Sporenbildung anzuregen.

6. ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Harnstoff. Impfung wie bei Versuch 5.

Nach 24 Stunden Makroskopisch: Trübung des Kondenswassers und eben sichtbarer Belag auf der Nährbodenoberfläche.
„ 48 „ Makroskopisch: Belag deutlich sichtbar, schwach gelblich, trübe durchscheinend.
„ 72 „ Makroskopisch: Belag etwas stärker.
Mikroskopisch: Schwärmoidien, z. T. mit jungen Sporenanlagen.

7. ⅓ D-Agar + 0,1 Proz. Na_2CO_3 + 0,2 Proz. Ammonkarbonat, auch Ammonagar von mir genannt.

Geimpft wie in Versuch 5.

Nach	5	Stunden	Keimung.
„	15	„	Makroskopisch: Kondenswasser ist schwach getrübt. Mikroskopisch: reichlich Schwärmoidien.
„	72	„	Makroskopisch: Deutlich sichtbarer, etwas erhabener, weißlich bis gelblichgrauer, etwas körniger, opalisierend durchscheinender Belag. Mikroskopisch: Schwärmoidien und Sporangien mit junger Sporenanlage.
„	96	„	Makroskopisch: kräftiger Belag. Mikroskopisch: Schwärmoidien und zahlreiche Sporangien mit z. T. fertiger, stark lichtbrechender Spore.

Wachstum auf Gelatine-Nährböden.

Von den vielen Wachstumsversuchen, die ich auf Gelatine-Nährböden gemacht habe (siehe auch p. 67 ff.), erwähne ich nur den folgenden ausführlich, weil auf ihm das relativ beste Wachstum eintrat.

Nährboden: ⅓ D-Gelatine + 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat.

Impfmaterial: 24-stündiges Oidienmaterial einer Ammon-Agarkultur.

a) Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 16. 8. 12. Nach 24 Stunden war deutliche Entwicklung zu sehen, der Stich hatte ein weißlichgraues, bei der Durchsicht schleierartiges Aussehen, einen spindel- oder rübenförmigen Wuchs und war etwa 2 cm tief in die Gelatine vorgedrungen. Es zeigte sich schon ein ganz schwacher Anfang der Verflüssigung, nach weiteren 2 Tagen ein kleiner, aber deutlicher Verflüssigungstrichter. Am 3. 10. 12 untersucht, war etwa 1 ccm verflüssigte Gelatine vorhanden, mikroskopisch wurden neben normalen dicke, z. T. angeschwollene Stäbchen, Mikroidien und Involutionsformen, aber keine Sporen beobachtet. Am 18. 12. 12 waren 2—3 ccm Gelatine verflüssigt.

b) Strich auf schräg erstarrter Gelatine am 16. 8. 12 ausgeführt. Nach 24 Stunden war ein dünner, weißlichgrauer Belag vorhanden, der in den nächsten Tagen glänzend und schleimig wurde. Am 22. 8. 12 war etwa ½ ccm, am 3. 10. 12 waren 2 ccm der Gelatine verflüssigt. In dieser Kultur wurden vorwiegend normale Stäbchen, sowie auch Sporenbildung beobachtet. Am 18. 12. 12 war das ganze Gelatineröhrchen, etwa 3—4 ccm, verflüssigt.

Da die Gelatine-Nährböden ihrer leichten Schmelzbarkeit wegen bei Zimmertemperatur gehalten werden mußten, das Wachstumsoptimum aber zwischen 28° und 35° liegt, so war das Wachstum im allgemeinen nicht sehr kräftig auf ihnen; der Entwicklungsgang von Spore zu Spore verlief auch nicht mit der bei Agar-Nährböden und 28° beobachteten Schnelligkeit und Regelmäßigkeit; es wurden meist dickere und längere Stäbchen, im allgemeinen aber weniger Sporen beobachtet, als auf den gleich zusammengesetzten Agar-Nährböden.

Wachstum auf Kartoffel.

Die Kartoffeln wurden nach Reinigung und Schälen mit dem Korkbohrer ausgestochen, die ausgestochenen Stücke schräg durchschnitten und die Keile teils ohne, teils mit Kreidezusatz im Dampftopf oder, was meist der Fall war, im Autoklaven ½ Stunde bei 125° C sterilisiert.

a) Während auf alten Kartoffeln ein Wachstum unsicher blieb, konnte es, wenn auch nicht gerade deutlich, auf jungen Kartoffeln beobachtet werden, zumal wenn sie zur Erhöhung des Feuchtigkeitsgehaltes mit 1 bis

2 ccm Wasser vor dem Sterilisieren versetzt worden waren; da wo das Wasser mit den Kartoffelstücken in Berührung war, hatte sich während des Erhitzens eine weiche Kartoffelmasse gebildet, auf der besseres Wachstum eintrat. Wenn auch normale Stäbchen und Sporen beobachtet wurden, so war doch die Entwicklung auf reinen Kartoffeln etwas geschwächt und verzögert.

b) Kartoffeln mit Kreidezusatz. Gutes Wachstum trat jedoch meist auf jungen Kartoffeln ein, die mit 1—2 ccm einer 2—5-proz. wäßrigen Kreideanschüttelung übergossen waren und nach dem Sterilisieren mit Material geimpft wurden, das auf harnstoffreien Nährböden gezüchtet worden war.

Der Belag war nicht immer deutlich von der Kartoffel zu unterscheiden; meist war er grauweiß bis gelblich gefärbt und am stärksten da ausgebildet, wo die Kartoffeloberfläche eine weiche Masse bildete. Der Verlauf des Entwicklungsganges von Spore zu Spore war nahezu derselbe, wie der auf Ammon-Agar beobachtete: d. h. bei 28° trat gewöhnlich nach 5—6 Stunden Keimung und nach 4 Tage langer Züchtung Sporenbildung ein. Die Stäbchen (s. Fig. 20—22) sind etwas dicker als die auf Ammon-Agar gebildeten, ebenso die Sporen (s. das Resultat der Sporenmessungen p. 227).

In älteren Kartoffelkulturen waren fast nur freie Sporen und Hemangien vorhanden, weniger Sporangien, noch weniger Stäbchen.

Wachstum auf Möhre.

Die Möhren wurden nach dem Abschaben der Oberfläche gereinigt und in längliche viereckige Stücke geschnitten, z. T. mit Kreide versehen und im Autoklaven bei 125° sterilisiert.

a) Möhre ohne Kreidezusatz. Als Impfmaterial dienten Sporen einer Harnstoff-Mineralagarkultur. Innerhalb 8 Tage langer Züchtung bei 28° war keine Entwicklung eingetreten.

b) Möhre mit 1—2 ccm einer wäßrigen 2—5-proz. Kreideanschüttelung versetzt: Die Entwicklung verlief ähnlich, wenn auch nicht so kräftig, wie die auf Kartoffelkreide beobachtete.

Die 6 Wochen alte Kultur zeigte makroskopisch einen dünnen, häutigen, weißlichgrauen und glänzenden Belag. Mikroskopisch waren sehr viele Sporen vorhanden.

Als Impfmaterial waren Oidien einer 24-stündigen Ammon-Agarkultur verwendet worden.

Wachstum in flüssigen Nährböden.

Die Untersuchung der Wachstumsmöglichkeit in flüssigen Nährböden ist von großer Wichtigkeit, denn sie ermöglicht bei Verwendung von Bouillon oder Milch, besonders aber bei Verwendung der vorwiegend konstant zusammengesetzten Nährlösungen von A. Meyer (1903. p. 24; bei Gottheil, 1901. p. 3) und der Berücksichtigung bestimmter Versuchsbedingungen, das Aufstellen weiterer, differentialdiagnostisch verwertbarer Merkmale; sie läßt auch ferner bei sorgfältiger Auswahl und Ergänzung der die Nährlösungen bildenden Substanzen erkennen, welche Ansprüche bezüglich seiner Ernährung der zu untersuchende Bazillus an Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen macht. Zu achten ist weiter auf die Bildung von Gasen, Giften, Säuren und Alkalien, Schleim usw., alles Stoffwechselprodukte, die sich nur oder doch viel besser in flüssigen als in festen Nährböden nachweisen lassen.

Die morphologischen Wachstumserscheinungen sind natürlich auch zu verfolgen, denn sie sind ja die unerläßliche Kontrolle für die Reinheit der Kultur. Die ausführliche Beschreibung des Wachstums und des Verlaufes der Entwicklung von Spore zu Spore in flüssigen Nährböden hat für die Speziesdiagnose gewöhnlich keinen großen Wert, da die Wachstumsverhältnisse in Flüssigkeiten meist weniger günstige und weniger gleichmäßige sind, als die auf festen Nährböden, auf denen demzufolge das Wachstum normaler und der Entwicklungsgang von Spore zu Spore schneller und regelmäßiger verläuft.

Zur Bestimmung der Entwicklungsstärke füllte ich nach dem im Marburger Institut (s. Gottheil, 1901; A. Meyer, 1903) üblichen Verfahren je 5 ccm der Nährlösungen in alkalifreie Reagensröhren (Firma Schott, Jena) von 15 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser. Es fanden, wie auch aus der Tabelle hervorgeht (Tab. III), außer den A. Meyerschen Nährlösungen noch 1-proz. Peptonbouillon, 10-proz. Peptonwasser und Milch Verwendung, und zwar waren die Nährlösungen entweder lackmusneutral oder sie waren mit Natriumkarbonat 0,1 Proz. oder mit Ammoniumkarbonat 0,2 Proz. oder mit 2 Proz. Harnstoff versetzt worden. Die Nährlösungen wurden teils mit abgekochten Sporen ausgereifter, teils mit Oidien 24 Stunden alter, normal vorbehandelter Ammon-Agarkulturen geimpft; in den Lösungen, in denen nach 8 Tagen keine Entwicklung eingetreten war, wurde die Impfung wiederholt. Die Kulturen wurden bei 28° C gezüchtet.

Tabelle der Wachstumsintensität in Nährlösungen:

Tabelle III.

Nährlösungen	0	I	II	III	IV	V	Vα	Vβ	Vγ	Vδ	VI	VIα
Lackmus neutral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„ „ + Natr. carb. 0,1%	2	2	1	0—1	0	0	0	0	0	0	0	0
„ „ + Amm. carb. 0,2%	3	3	2	0—1	1	1					0	0
„ „ + Harnstoff 2,0%	3	3	2	1	1	1					0	0

Nährlösungen	VII	VIIa	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	Bouillon	Peptonlösung 1 : 10	Milch
Lackmus neutral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„ „ + Natr. carb. 0,1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	
„ „ + Amm. carb. 0,2%	0	0	0	0—1	1	0	0	0	0	0	0	4	2	2
„ „ + Harnstoff 2,0%	0	0	0	0—1	1	0	0	0	0	0	0	4	2	2

Intensitätstabelle: 0 bedeutet keine Entwicklung, Lösung völlig klar;
0—1 bedeutet ganz schwache Entwicklung, Lösung ganz schwach getrübt;
1 bedeutet schwache Entwicklung, Lösung schwach getrübt;
2 bedeutet deutliche Entwicklung, Lösung deutlich getrübt;
3 bedeutet kräftige Entwicklung, Lösung stark getrübt;
4 bedeutet sehr kräftige Entwicklung, Lösung sehr stark getrübt.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, fand in keiner der neutralen Nährflüssigkeiten ein bemerkenswertes Wachstum statt, ein Resultat, das wiederholt beobachtet wurde und das schließlich auch nach den Beobachtungen des Wachstums auf festen neutralen Nährböden erwartet werden konnte. Von den mit Natriumkarbonat versetzten Nährböden zeigten nur die peptonhaltigen eine Entwicklung, während in den asparaginhaltigen Nährlösungen erst bei Gegenwart von Ammoniumkarbonat oder Harnstoff ein Wachstum eintrat. Die Zusätze von Ammonkarbonat oder Harnstoff ermöglichten auch in normaler, fetthaltiger, wie fettfreier Milch eine Entwicklung des Bacillus probatus.

Wachstumserscheinungen in Nährlösungen.

Die Art der Impfung ist oben angegeben. Bei keiner der untersuchten flüssigen Kulturen wurde Kahmhautbildung beobachtet. Die Bakterien bildeten im Anfang bei kräftigem Wachstum meist eine schleierartige Trübung in der Nähe der Flüssigkeitsoberfläche, die Trübung verbreitet sich dann gewöhnlich schlierenförmig durch die ganze Flüssigkeit und schließlich bildet sich fast immer ein Bodensatz, der je nach den Nähr- und Kulturbedingungen mehr oder weniger stark, mehr oder weniger schleimig ist; die darüber stehende Flüssigkeit kann selbst auch mehr oder weniger schleimig und fadenziehend werden. Die in den flüssigen Nährböden gebildeten Morphoden sind fast durchweg normal und einheitlich, als die, welche auf festen Nährböden unter optimalen Bedingungen wachsen: die Oidien werden dünner und länger, neigen wohl auch zur Fadenbildung, Involutionsformen und geschwächte Stäbchen treten häufiger auf, der Entwicklungsgang der Morphoden von Spore zu Spore ist nicht so regelmäßig, Sporen sind selbst in 4 Wochen alten Kulturen meist nur vereinzelt zu beobachten. Häufiger traten Sporen auf in den unter besonders günstigen Bedingungen gezüchteten asparaginhaltigen Kulturlösungen (s. Tab. VI).

Nährlösung 0 + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Nach 10 Tagen untersucht: Makroskopisch schlierenförmige Trübung, mikroskopisch normale und geschwächte Stäbchen.

Nährlösung I + 2 Proz. Harnstoff.

Nach 4 Wochen untersucht: Makroskopisch schlierig getrübte Flüssigkeit und trüber, schleimiger Bodensatz; mikroskopisch Oidien ein- und zweistäbig, von verschiedener Dicke und Länge, viele Involutionsformen, aber nur vereinzelt Sporenbildung (Fig. 44).

Nährlösung II + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Nach 4 Wochen untersucht: Makroskopisch schwach getrübte Flüssigkeit, schwach schleimiger Bodensatz; mikroskopisch vorwiegend sehr dünne und durchschnittlich etwa 10 μ lange Stäbchen und nur ganz wenige Sporen.

Nährlösung III + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Nach 4 Wochen untersucht: Makroskopisch kaum bemerkbare Trübung, mikroskopisch stark geschwächte Stäbchen, weder Sporangien, noch Sporen.

Bouillon + 0,1 Proz. Na_2CO_3 + 1 Proz. Pepton (Witte).

Nach 8 Wochen untersucht: Makroskopisch schlierig getrübte Flüssigkeit mit dickem, schleimig trübem Bodensatz; mikroskopisch ein- und zweistäbige Oidien verschiedener Dicke und Länge, vorwiegend aber Fadenbildung; unter den sehr langen Fäden (Fig. 41) war ein 103 μ langer; nur ganz wenige Sporen.

Bouillon + 5 Proz. Pepton + 0,2 Proz. Ammonkarbonat.

Die Versuche wurden mit je 20 ccm der Bouillon in alkalifreien Jenaer Kölbchen mit flachem Boden angesetzt und mit abgekochtem Sporenmaterial der 40. Kulturgeneration geimpft.

Nach 2-tägiger Kultur bei 28° wurde makroskopisch nur eine schwache Trübung, mikroskopisch auch nur ein schwaches Wachstum beobachtet.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Nach 4 Wochen war die Flüssigkeit intensiv getrübt und ein schleimiger, weißlichgrauer Bodensatz vorhanden. Mikroskopisch waren ziemlich dicke und lange, sonst aber normale Stäbchen, aber auch annähernd ebensoviel geschwächte Stäbchen gebildet. Sporenbildung wurde auch hier nur vereinzelt beobachtet.

Bouillon + 5 Proz. Pepton + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

In den wie oben angesetzten und geimpften Kulturen trat nur eine ganz geringe Entwicklung ein.

Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Die Beobachtungen, die ich beim Studium der Harnstoffspaltung in den später (s. Kapitel der Harnstoffspaltung) beschriebenen Kulturgefäßen machte, die 200 ccm faßten und 20 ccm der obigen Lösung enthielten, sind folgende:

Als Impfmaterial wurden 10 Millionen Sporen einer ausgereiften, normal vorbehandelten Ammon-Agarkultur benutzt, die ¼ Minute bei 100° erhitzt worden waren. Versuchstemperatur war 28°. Makroskopisch: Nach 15 bis 20 Stunden war zuerst eine schwache, aber doch deutliche schleierartige Trübung nahe der Flüssigkeitsoberfläche zu bemerken, ferner das vereinzelte Auftreten von ganz kleinen Kristallen, die bei der Durchsicht der ungeschwenkten Flüssigkeit aufleuchteten und bei fortschreitender Kulturentwicklung noch zahlreicher wurden. Die dann schlierig getrübte Flüssigkeit klärte sich immer mehr unter Bildung eines weißlichgrauen, später dunkler werdenden schleimigen Bodensatzes; dieser war schon nach einigen Tagen sehr dick, veränderte sich aber dann äußerlich nicht mehr sehr bei längerem Stehen der Kultur. Mikroskopisch: Nach 5—6 Stunden wurde Keimung beobachtet, nach 15—20 Stunden waren reichlich Schwärmoidien in den Kulturen, der größere Teil der Sporen also gekeimt.

Die Oidien waren vorwiegend dünner als die unter normalen Verhältnissen auf Ammon-Agar gewachsenen, neigten z. T. auch zur Fadenbildung und machten, zumal in der vergorenen Flüssigkeit, einen geschwächten Eindruck. Der Bodensatz bestand vorwiegend aus Stäbchen und Fäden, die in großer Zahl miteinander verschleimt waren. Sporen waren nur vereinzelt vorhanden.

Magermilch und Vollmilch.

In gewöhnlicher Milch fand kein Wachstum und keine Veränderung statt. Wurden der Milch aber 2 Proz. Harnstoff oder 0,2 Proz. Ammonkarbonat zugesetzt, so trat eine allmähliche Klärung, eine Peptonisierung des Milchkaseins ein; die Flüssigkeit wurde dick und schleimig, veränderte sich aber nicht sehr merklich vom 8. Tage der Kultur ab. Mikroskopisch waren normale und geschwächte Stäbchen und nur ganz vereinzelt Sporen vorhanden.

Bezüglich des makroskopischen und mikroskopischen Wachstums in anderen Kulturlösungen sehe man die folgenden Tabellen, vor allem die Tabelle VI.

Ansprüche an Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen.

Wenn auch die Resultate der auf Tabelle III verzeichneten Nährlösungsversuche schon manche Schlüsse bezüglich der Ernährungsbedingungen zu ziehen erlaubten, so schien es doch geboten, zur genauen Festlegung der Ansprüche an N- und C-Verbindungen weitere Versuche zu machen. Hierzu wurden 50 ccm verschieden zusammengesetzter Nährlösungen in alkalifreie, 200 ccm fassende Erlenmeyer-Kölbchen mit flachem Boden gefüllt, in ähnlicher Weise wie die Nährlösungen der Tabelle III geimpft und ebenfalls bei 28° kultiviert; es hatte sich nämlich herausgestellt, daß unter den veränderten Kulturbedingungen ein besseres Wachstum eintrat, als in den Reagensglaskulturen mit höherer Flüssigkeitsschicht, aber geringerer Flüssigkeitsmenge.

Als Grundlösung diente in allen auf den Tabellen III—VII verzeichneten Versuchen die stickstoffreie mineralische Nährlösung, genannt M-Nährlösung, bestehend aus (s. A. Meyer, 1903. p. 15):

KH_2PO_4	1,0	g
$MgSO_4 + 7 H_2O$	0,3	g
$CaCl_2$	0,1	g
NaCl	0,1	g
Fe_2Cl_6	0,01	g
Wasser	1000,0	g.

Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat setzt man zweckmäßigerweise zuletzt zu.

Tabelle IV.

Impfmaterial: Bei den Versuchen a Sporen der 63 auf Ammonagar gew. Kulturgeneration, bei den Versuchen b 24-stündige Oidien der 63 auf Ammonagar gew. Kulturgeneration. Versuchs-Temperatur 28° C. Versuchs-Dauer: Für jeden Versuch mindestens 2 Wochen. Kulturflüssigkeit: M-Nährlösung 50,0 + Natr. carb. 0,1%, der verschiedene N-Verbindungen und verschiedene Mengen Fleischextrakt zugesetzt wurden.

Stickstoff-Verbindungen 0,2 %	Versuch I		Versuch II	
	a enthält 0,05 g Fleischextrakt	b enthält 0,05 g Fleischextrakt	a enthält 0,1 g Fleischextrakt	b enthält 0,15 g Fleischextrakt
—	0	0	0	0—1
Harnstoff	0—1	1	1	1—2
Biuret	0	0	0—1	0—1
Glykokoll	0	0	0	0
Azetamid	0	0	0	0
Oxamid	0	0	0	0
Succinimid	0	0	0	0
Leuzin	0	0	0	0
Urethan	0	0	0	0
Harnsäure	0	0	0	0

Stickstoff-Verbindungen 0,2 %	Versuch III		Versuch IV		Versuch V
	a enthält 0,2 g Fleischextr.	b enthält 0,3 g Fleischextr.	a enthält 0,5 g Fleischextr.	b enthält 0,4 g Fleischextr.	a u. b enthält 0 g Fleischextr.
—	0—1	1	1—2	1—2	0
Harnstoff	1—2	2	3	3	0
Biuret	1	1—2	2	2	0
Glykokoll	0—1	1	1—2	1—2	0
Azetamid	0—1	1	1	1	0
Oxamid	0—1	1	1	1	0
Succinimid	0	0—1	1	1	0
Leuzin	0—1	1	1—2	1—2	0
Urethan	0—1	0—1	1	1	0
Harnsäure	0—1	0—1	1	1	0

Der alkalischen M-Nährlösung wurden, wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist, organische Verbindungen, darunter Harnstoff und harnstoffverwandte Substanzen, zugesetzt, die z. T. möglicherweise gleichzeitig als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dienen konnten. Es trat jedoch kein Wachstum ein, wenn nicht bestimmte Mengen Fleischextrakt zugegen waren. Bei Gegenwart von Harnstoff war nur ein ganz geringer Zusatz von Fleischextrakt nötig, um ein Wachstum zu ermöglichen. Da aber bei gleich geringen Mengen Fleischextrakt ohne Harnstoff keine Zellvermehrung eintrat, diese wurde erst bei Zusatz von 0,3 Proz. Fleischextrakt beobachtet, so war damit bewiesen, daß der Harnstoff tatsächlich das Wachstum förderte. In ganz geringem Maße war das auch bei Biuret der Fall. Glykokoll, Leuzin, Azetamid und Oxamid übten keinen wachstumsfördernden Einfluß aus; sie, besonders aber Harnsäure, Urethan und Succinimid hemmten vielmehr etwas das Wachstum, konnten es allerdings bei genügendem Zusatz von Fleischextrakt nicht ganz verhindern.

Da der den Nährlösungen zugesetzte Fleischextrakt schon Ammoniak in geringen Mengen enthielt, so war es nicht angängig, ohne quantitative Ammoniakbestimmungen, den qualitativ in allen Kulturlösungen nachgewiesenen Ammoniak als Abbauprodukt der zugesetzten Stoffe anzusehen. Sehr wahrscheinlich ist es allerdings nicht, zumal bei Berücksichtigung des geringen Wachstums, daß die organischen Verbindungen, ausgenommen Harnstoff und vielleicht auch Biuret, von den Bakterien angegriffen und abgebaut wurden, da diesen ja im Fleischextrakt eine ausreichende N-Quelle zur Verfügung stand.

Tabelle V.

Impfmaterial: Bei den Versuchen a Sporen der 62. und 63. auf Ammonagar gew. Kulturgeneration, bei den Versuchen b 24-stündige Oidien der 62. und 63. auf Ammonagar gew. Kulturgeneration.

Beobachtung: Nach 3, 6, 10, 70 Tagen.

0 = keine Entwicklung, 1 = schwache Entwicklung.

Versuchs-No.	Zusammensetzung der Nährlösung				Wachstumskraft
	%	%	%	%	
1 a	M-Nährlösung 50,0	Natr. carb. 0,1	Dextrose 0,5	Harnstoff 0,2	1 (Schwärmoidien)
1 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	1 (Schwärmoidien)
2 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Kreatin 0,2	0
2 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0
3 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Kreatinin 0,2	0
3 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0
4 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Guanidin mur. 0,2	0
4 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ „ 0,2	0
5 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Thioharnstoff 0,2	0
5 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0
6 a	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	Cyanursäure 0,2	0
6 b	„ „ 50,0	„ „ 0,1	„ 0,5	„ 0,2	0

Wie aus der Tabelle V zu ersehen ist, findet in alkalischer M-Nährlösung bei Anwesenheit von Dextrose auf Zusatz von Harnstoff ein deutliches, wenn auch recht schwaches Wachstum statt. Setzt man aber statt des Harnstoffes Kreatin oder Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff oder Cyanursäure zu der zuckerhaltigen M-Nährlösung, so tritt keine Bakterienentwicklung ein. Die genannten stickstoffhaltigen Verbindungen vermögen also den Harnstoff als Stickstoffquelle nicht zu ersetzen.

Aus den in Tabelle VI verzeichneten Versuchen geht hervor, daß Natriumnitrit als Stickstoffquelle nicht verwertbar ist, daß ferner, wie dies auch schon aus Tabelle III zu ersehen war, Asparagin allein mit alkalischer M-Nährlösung keine Wachstumsmöglichkeit gibt, daß aber auf Zusatz von Ammonkarbonat oder Harnstoff ein deutliches Wachstum zu erreichen ist. Dieses wird stärker, wenn Dextrose oder Saccharose und Glyzerin zugesetzt werden. Enthält die alkalische M-Nährlösung kein Asparagin, sondern außer Ammoniumkarbonat oder Harnstoff nur noch Dextrose, so ist das Wachstum ein recht schwaches und wird auch durch Glyzerinzusatz nicht stärker. Läßt man nun auch den Zucker weg, setzt man der alkalischen M-Nährlösung nur kohlensaures Ammonium zu, so tritt in dieser Nährlösung immer noch Vermehrung ein, Sporenkeimung und Oidienwachstum; allerdings ist dieses schwach, so daß es makroskopisch an einer Trübung kaum zu erkennen ist; dagegen konnte durch die weiter unten beschriebenen Zählversuche eine Vermehrung der Zellen nachgewiesen und damit gezeigt werden, daß kohlensaures Ammonium in einer stickstoff- und sehr wahrscheinlich auch kohlenstoffreien Salzlösung bis zu gewissem Grade von den Bakterien als Stickstoffquelle und, wie gesagt, sehr wahrscheinlicherweise auch als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden kann.

Verwertbarkeit von Ammoniumkarbonat als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle.

Die zum Zwecke der Feststellung einer Verwertbarkeit von kohlensaurem Ammonium als N- und C-Quelle unternommenen Versuche sind aus der Tabelle VII zu ersehen.

Die bei einigen Versuchslösungen ausgeführten Keimzählungen wurden in der Thoma-Zeißschen Zählkammer vorgenommen. Die Beschreibung der Zählmethode siehe p. 292 ff. Die Resultate dieser Zählungen waren folgende (s. auch die Tabelle VII):

Erste Zählversuchsreihe.
Versuchsmaterial war die 3 Wochen alte Versuchslösung 4 der Tabelle VII.
Zählung 1: Die Versuchslösung wurde nicht verdünnt.
„ 1: Auf 140 Quadrate kamen 43 Stäbchen, 41 Sporen
demnach „ 140 „ „ 84 Zellen
„ 1 „ „ 0,6 „
„ 1 ccm der Versuchslösung 4 = 0,6 . 4 Millionen,
„ 1 „ „ „ 4 = 2,4 Millionen Zellen.
Zählung 2: Die Versuchslösung wurde 1 : 3 verdünnt.
1 ccm der Versuchslösung 4
0,5 „ Kupferoxydammoniak
0,85 „ Schwefelsäure (3 Proz.)
0,65 „ Methylenblau (1 + 10).
„ 2: Auf 40 Quadrate kamen 4 Stäbchen, 5 Sporen
„ 40 „ „ 9 Zellen
„ 1 „ „ 0,225 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung = 0,225 . 4 Millionen = 0,9 Millionen
„ 1 „ „ Versuchslösung 4 = 2,7 Millionen Zellen.
Die Versuchslösung 4 enthielt demnach in 50 ccm 127 Millionen Zellen.

Zweite Zählversuchsreihe.
Versuchsmaterial war die 8 Tage alte Versuchslösung 5 d. Tab.

Tabelle VI.

Versuchs-Nummer	Zusammensetzung der Nährlösungen								
	M-Nährlösung	Natr. carb.	Ammon. carb.	Harnstoff	Asparagin	Dextrose	Rohrzucker	Glyzerin	Natr. nitrit
1	50,0 %				1 %				
2	50,0 %	0,1 %			1 %				
3	50,0 %	0,1 %					0,5 %		0,2 %
4	50,0 %	0,1 %	0,2 %						
5	50,0 %	0,1 %	0,5 %						
6	50,0 %	0,1 %	0,2 %			0,2 %			
7	50,0 %	0,1 %	0,2 %			0,5 %			
8	50,0 %	0,1 %		0,2 %		0,2 %			
9	50,0 %	0,1 %		0,2 %		0,5 %			
10	50,0 %	0,1 %	0,2 %			0,5 %		1 %	
11	50,0 %	0,1 %	0,2 %		1 %				
12	50,0 %	0,1 %		0,2 %	1 %				
13	50,0 %	0,1 %	0,2 %		0,2 %	0,5 %			
14	50,0 %	0,1 %	0,2 %		1 %	3 %			
15	50,0 %	0,1 %		0,2 %	1 %	3 %			
16	50,0 %	0,1 %	0,2 %		0,2 %		0,5 %	0,5 %	
17	50,0 %	0,1 %	0,2 %		1 %		0,5 %	1 %	
18	50,0 %	0,1 %		0,2 %	1 %		0,5 %	1 %	

Versuchs-Nummer		Beobachtungen						Nitritbildung
		nach 3 Tagen	nach 5 Tagen	nach 10 Tagen	nach 20 Tagen makroskopisch	nach 20 Tagen mikroskopisch	nach 6 Wochen	
1	a	0	0	0	0	—	0	—
	b	0	0	0	0	—	0	—
2	a	0	0	0	0	—	0	—
	b	0	0	0	0	—	0	—
3	a	0	0	0	0	—	0	—
	b	0	0	0	0	—	0	—

4	a	0	0	0	0—1	wenig Oidien	0—1	sehr schwach
	b	0	0	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
5	a	0	0	0	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
6	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
7	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
8	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
9	a	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	„ „
10	a	0	0	0	0—1	wenig Oidien	0—1	„ „
	b	0	0	0	0—1	„ „	0—1	„ „
11	a	0	0—1	1	1	viel Oidien, zieml. viel Sporen	1	„ „
	b	0—1	1	2	2	„ „ „ „ „	2	deutlich
12	a	0	0—1	0—1	0—1	„ „ „ „ „	1	schwach
	b	0	0—1	1	1	„ „ „ „ „	2	deutlich
13	a	0—1	0—1	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	sehr schwach
	b	0—1	0—1	1	1	„ „ „ „ „	1	„ „
14	a	0—1	2	3	3	sehr viel Oidien, viel Sporen	3	sehr stark
	b	0—1	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„ „
15	a	0	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„ „
	b	0—1	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„ „
16	a	0	0	0—1	0—1	wenig Oidien, sehr wenig Sporen	0—1	sehr schwach
	b	0	0—1	1	1	„ „ „ „ „	1	„ „
17	a	1	2	3	3	sehr viel Oidien, viel Sporen	3	stark
	b	2	3	3	3	„ „ „ „ „	3	„
18	a	0—1	1	2	2	„ „ „ „ „	2	„
	b	1	2	3	3	„ „ „ „ „	3	„

Impfmaterial: Bei den Versuchen **a** = Sporen der 62. und 63. Kulturgeneration (auf Ammon-Agar gewachsen);
b = Oidien der 63. und 64. Kulturgeneration (einer 24 Stunden alten Ammon-Agarkultur entnommen).

Intensitätstabelle: 0 bedeutet keine Entwicklung, Lösung völlig klar;
0—1 bedeutet ganz schwache Entwicklung, Lösung ganz schwach getrübt;
1 bedeutet schwache Entwicklung, Lösung schwach getrübt;
2 bedeutet deutliche Entwicklung, Lösung deutlich getrübt;
3 bedeutet kräftige Entwicklung, Lösung stark getrübt.

Zählung: Die Versuchslösung wurde folgendermaßen verdünnt:
1 ccm der Versuchslösung 5
1 „ Kupferoxydammoniak
1 „ Schwefelsäure (5 Proz.)
1 „ Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 : 4.

Zählung: Auf 120 Quadrate kamen 8 Stäbchen und 8 Sporen
„ 120 „ „ 16 Zellen
„ 1 „ „ 0,133 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,133.4 Millionen
„ 1 „ „ „ „ 0,532 „
„ 1 „ „ Versuchslösung 5 kamen 2,128 Millionen Zellen.

Die Versuchslösung 5 enthielt demnach in 50 ccm 106 Millionen Zellen.

Diese 106 Millionen Keime, Sporen und Stäbchen je zur Hälfte, waren aus 2,5 Millionen Keimen, etwa auch zur Hälfte aus Sporen und Stäbchen bestehend, innerhalb 8 Tagen bei 28° gewachsen.

Dritte Versuchsreihe der Keimzählungen.

Versuchsmaterial war die 5 Wochen alte Versuchslösung 6 und zwar 6 a, 6 b und 6 c der Tabelle.

Zur Zählung wurden die Versuchslösungen wie folgt verdünnt:
Je 1 ccm der Versuchslösungen 6 a, 6 b, 6 c
+ 0,5 ccm Kupferoxydammoniak
+ 0,85 „ Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 0,65 „ Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 : 3.

Versuch A. Zählung der Versuchslösung 6 a, geimpft mit 0,2 ccm Impfmaterial.

Zählung 1: Auf 200 Quadrate kamen 54 Zellen
„ 2: „ 120 „ „ 36 „
„ 320 „ „ 90 „
„ 1 „ „ 0,28 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,28 . 4 Millionen Zellen
„ 1 „ „ „ „ 1,12 Millionen Zellen
„ 1 „ „ Versuchslösung 6 a kamen 3,36 Millionen Zellen
„ 50 „ „ „ „ „ 168 „ „

Diese 168 Millionen Zellen, bestehend aus Stäbchen und Sporen, waren aus rund 0,4 Millionen Zellen, zur Hälfte Stäbchen, zur Hälfte Sporen, innerhalb 5 Wochen bei 28° entstanden.

Versuch B. Zählung der Versuchslösung 6 b, geimpft mit 0,5 ccm der Versuchslösung 5.

Zählung 1: Auf 80 Quadrate kamen 20 Zellen
„ 1 „ „ 0,25 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,25 . 4 Millionen
„ 1 „ „ „ „ 1 Million Zellen
„ 1 „ „ Versuchslösung 6 b kamen 3 Millionen Zellen
„ 50 „ „ „ 6 b „ 150 „ „

Diese 150 Stäbchen und Sporen, bestehend aus Stäbchen und Sporen, waren aus rund 1 Million Zellen, zur Hälfte Stäbchen, zur Hälfte Sporen, innerhalb 5 Wochen bei 28° C hervorgegangen. Da die Zellzahl etwas kleiner ist, als die in Versuch 6 a und 6c beobachtete, so hebe ich hervor, daß in Versuch B, der lediglich zur Kontrolle dienen sollte, nur 80 Quadrate ausgezählt wurden und daß demzufolge die Zellzahl weniger absolut genau ist, als die der Versuche A und C, deren Zellzahl durch Auszählen von 320 und 200 Quadraten in dem letzten Falle gewonnen wurde.

Möglich ist allerdings auch, daß tatsächlich etwas weniger Zellen in dem Versuche 6b gebildet wurden.

Versuch C. Zählung der Versuchslösung 6 c, geimpft mit 1 ccm der Versuchslösung 5.

Zählung 1: Auf 100 Quadrate kamen 32 Zellen
„ 2: „ 100 „ „ 33 „
„ 200 „ „ 65 „
„ 1 „ „ 0,325 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,325,4 = 1 . 3 Millionen
„ 1 „ „ Versuchslösung 6 c kamen 3.9 Millionen Zellen.
„ 50 „ „ „ 6 c „ 195 „ „

Diese 195 Millionen Zellen, bestehend aus Stäbchen und Sporen, waren aus rund 2 Millionen Keimen, zur Hälfte Sporen, zur Hälfte Stäbchen, innerhalb 5 Wochen bei 28° C hervorgeangen.

Vierte Zählversuchsreihe.

Versuchsmaterial war die Versuchslösung 7, 3 Wochen alt. Zur Zählung wurde die Versuchslösung folgendermaßen verdünnt:

1 ccm der Versuchslösung 7
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 1 „ Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 2 „ Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 : 5.

Zählung: Auf 100 Quadrate kamen 11 Stäbchen und 14 Sporen
„ 100 „ „ 25 Zellen
„ 1 „ „ 0,25 Zellen
„ 1 ccm der Verdünnung kamen 0,25 . 4 Millionen Zellen
„ 1 „ „ Versuchslösung 7 kamen 5 Millionen Zellen
„ 38 „ „ „ „ 190 Millionen Zellen.

Diese 190 Millionen Zellen, bestehend aus etwas mehr Sporen als Stäbchen waren aus rund 2 Millionen Zellen, zur Hälfte Sporen, zur Hälfte Stäbchen, innerhalb 3Wochen bei 28° hervorgegangen.

Wie aus der Tabelle VII hervorgeht, wurde als Ausgangsmaterial eine mit jungem, kräftigem Oidienmateriale geimpfte Kulturlösung benutzt, die außer M-Nährlösung und Ammonkarbonat noch eine bestimmte Menge Asparagin enthielt. Alle weiteren Versuchslösungen mit einziger Ausnahme der Versuchslösung 3 blieben frei von einem Asparaginzusatz, konnten also nur das in den ganz geringen Impfmengen mit übergeführte Asparagin enthalten. Die Mengen Asparagin, die so möglicherweise (s. die theoretisch der Verdünnung gemäß berechnete Gehaltstabelle) in die Nährlösungen hineingelangen konnten, sind so klein, daß sie praktisch wohl kaum berücksichtigt zu werden brauchen; zumal wenn man bedenkt, daß wir ja in den früheren Versuchen (s. Tabelle VI) bei Gegenwart von Ammonkarbonat eine Verwertbarkeit des Asparagins als Stickstoffquelle festgestellt haben und demnach zu Nährlösungen zugesetzte Spuren von Asparagin bei fortschreitender Kulturentwicklung aufgebraucht werden müssen. Die geringe Keimzahl von 127 Millionen Keimen in der Versuchslösung 4, die mit 0,2 ccm der ursprünglich bestimmt asparaginhaltigen Nährlösung 3 geimpft worden war, macht es wahrscheinlich, daß entweder kein Asparagin mit dem Impfmaterial in sie überführt wurde, oder daß ganz geringe Mengen Asparagin keinen wesentlich wachstumsfördernden Einfluß ausüben (s. auch das Versuchsresultat 16 der Tabelle VI).

Aus den Versuchen 6 a—6 c und 7, in denen etwas stärkeres Wachstum als in Versuchslösung 4 beobachtet werden konnte, scheint eine Anpassung an den Ammonkarbonatnährboden hervorzugehen.

Nehmen wir nun an, daß die genannten Nährlösungen 4—7, vor allem aber Versuchslösung 7, asparaginfrei sind, wozu wir wohl nach den mitgeteilten Beobachtungen berechtigt sind, dann ist mit der Feststellung des Wachstums in einer nur aus stickstoffreier Salzlösung und kohlensaurem Ammon bestehenden Nährlösung bewiesen, daß das kohlensaure Ammon die Stickstoffquelle sein muß. Da eine andere Kohlenstoffquelle als Ammonkarbonat der Kulturlösung nicht zugesetzt wurde, so muß demnach dieses in unserem Falle auch noch als Kohlenstoffquelle dienen. Nun wäre es ja denkbar, daß bei unserer Versuchsanordnung aus den zum Verschluß der Versuchskolben dienenden Wattepfropfen, oder aus der Luft, schließlich auch mit dem benutzten destillierten Wasser geringe Mengen kohlenstoffhaltiger, organischer Substanz in die Nährlösungen gelangt waren und so die Vermehrung der Zellen erst ermöglichten.

Tabelle VII.

Versuchs-Nummer	Nährlösung	Gehalt in g an		Versuchstemperatur	Art und Menge des Impfmaterials	Versuchsdauer	Keimzahl am Ende des Versuchs	Keimzahl am Anfang des Versuchs
		Ammon-Karbonat	Asparagin					
1	M-Nährlösung 50,0	0,1	0,5	28°	Oidien einer 24 Stunden alten Ammonagarkultur	2 Wochen	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt
2	„ „ 50,0	0,1	0,002	28°	ca. 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 1	2 „	„ „	„ „
3	„ „ 50,0	0,1	0,025 008	28°	ca. 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 2	2 „	„ „	„ „
4	„ „ 50,0	0,25	0,000 100 032	28°	ca. 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 3	3 „	127 Millionen	„ „
5	„ „ 50,0	0,25	0,000 002 006	28°	genau 1,0 ccm der Nährlösung des Versuches 4	1 „	106 „	2,5 Millionen
6a	„ „ 50,0	0,25	0,000 000 008	28°	genau 0,2 ccm der Nährlösung des Versuches 5	5 „	168 „	0,4 „
6b	„ „ 50,0	0,25	0,000 000 020	28°	genau 0,5 ccm der Nährlösung des Versuches 5	5 „	ca. 150 „	1 „
6c	„ „ 50,0	0,25	0,000 000 040	28°	genau 1,0 ccm der Nährlösung des Versuches 5	5 „	195 „	2 „
7	„ „ 38,0	0,25	0,000 000 000 8	28°	genau 1,0 ccm der Nährlösung des Versuches 6c	3 „	190 „	4 „

Diese Annahme ist jedoch recht unwahrscheinlich: einmal stimmen die Keimzahlen der verschiedenen Versuche gut überein, welche Beobachtung auf gleichmäßige Ernährungsweise schließen läßt; ferner ist die allerdings für Bakterien recht minimale Vermehrung — im günstigsten Falle von 0,4 auf 168 Millionen Keime — doch immerhin größer, als wir sie uns durch so zufällige Verunreinigung wie die genannten entstanden denken können. Ganz exakt würden allerdings die Versuche nur genannt werden können, wenn durch Verwendung eines ganz besonders reinen destillierten Wassers und durch einen anderen Kolbenverschluß jede Verunreinigung der oben angedeuteten Art vermieden worden wäre.

Unserer Anschauung gemäß müßte also der Bac. probatus zu den autotrophen Ammoniakbakterien zu rechnen sein, da er trotz starker Schwächung, die sich an der minimalen Vermehrung und seinem morphologischen Aussehen geltend macht doch mit Ammonkarbonat zur Not als N- und C-Quelle auskommen zu können scheint.

Bevor ich nun zum Schlusse dieses Abschnittes die Resultate meiner Versuche nochmals zusammenstelle, will ich kurz auf die Resultate anderer Forscher, die sich mit Harnstoffbakterien bezüglich deren Ansprüche an Stickstoff und Kohlenstoffquelle beschäftigt haben, eingehen oder doch wenigstens ihre Versuche erwähnen.

v. Jaksch (1881) machte umfangreiche Versuche mit Nährlösungen, welche die verschiedensten N- und C-Quellen enthielten; da seine Versuche aber nur mit Micrococcus ureae gemacht wurden, so kommen seine Resultate für uns nicht in Betracht.

Beijerinck (1901) konnte bei seinen Anhäufungsversuchen in reiner Harnstofflösung keine Bakterien zur Entwicklung bringen; setzte er aber dann Ammonoxalat, Natriumazetat, Ammonzitrat, Ammonmalat oder Kaliumnatriumtatrat hinzu, so wurde der Harnstoff durch die sich entwickelnden Bakterien abgebaut, wobei, wie es Beijerinck schien, ein bis zwei bestimmte, für die Kohlenstoffquelle charakteristische, Harnstoffbakterienformen erhalten wurden, die allerdings nicht isoliert wurden und vermutlich asporogen waren.

Die stärker harnstoffspaltenden Formen erhielt er bei seinen Anhäufungsversuchen erst dann, wenn in der Nährlösung eine vorzügliche N- oder C-Quelle zugegen war. Weitere Versuche bezüglich ihrer Ernährungsansprüche scheint Beijerinck mit Reinkulturen von Harnstoffbakterien nicht gemacht zu haben. Miquel (1898) fand, daß Pepton für Harnstoffgärer ein viel besserer Nährstoff ist als Harnstoff, daß aber nur das Pepton Chapoteau, nicht das von Witte brauchbar war.

Es geht nun aus meinen Versuchen bezüglich der Verwertbarkeit von Stickstoff- und Kohlenstoffquellen insgesamt hervor, daß Harnstoff als N- und C-Quelle nicht brauchbar ist, ebensowenig Biuret; in geringem Maße scheint es aber bei Ammonkarbonat der Fall zu sein und in deutlichem Grade ist es unter bestimmten Bedingungen (Alkalität der Nährlösung) bei Liebigs Fleischextrakt und Pepton (Witte) der Fall. Bei Gegenwart einer guten Kohlenstoffquelle können Harnstoff, Ammonkarbonat und auch Biuret in ganz geringem Maße als Stickstoffquelle dienen. Sind Harnstoff oder Ammonkarbonat in der Nährlösung zugegen, dann ist Asparagin ebenfalls als Nährquelle ausnutzbar; welcher Art ist zweifelhaft, doch vermute ich, daß Asparagin vorwiegend eine N-Quelle ist, da erst auf Zusatz guter C-Quellen, wie Dextrose, oder Rohrzucker und Glyzerin, eine kräftige Entwicklung in der Nährlösung eintritt.

Während auf festen Nährböden, z. B. D-Agar, selbst bei starker Alkalität bei 1 Proz. Traubenzucker gar kein oder doch nur ein kümmerliches Wachstum stattfindet, werden in einer asparagin- und ammoniumkarbonathaltigen Nährlösung noch 3 Proz. sehr gut vertragen und als Kohlenstoffquelle benutzt.

Nach neueren Versuchen (siehe Czapek, 1908) ist Urobacillus pasteurii, der, wie wir sehen werden, mit Bac. probatus identisch ist, extrem saccharophob; unter saccharophoben Bakterien sollen solche verstanden sein, die nach Überimpfung aus stark verdünnter $^1/_{1000}$ Dextrose-Nährlösung in eine 12 Proz. Dextrose enthaltende nicht mehr wachsen können. Kontrollversuche habe ich in dieser Richtung nicht gemacht.

Will man aber als Merkmal für Harnstoffbakterien das Maximum des Traubenzuckerzusatzes festlegen, so darf man nur eine Nährlösung von konstanter Zusammensetzung und konstantem Alkalitätsgrad nehmen, muß von kräftigem, normal vorbehandeltem Bakterienmateriale ausgehen und besonders darauf achten, ob das Maximum des möglichen Zuckerzusatzes konstant genug ist, um als differentialdiagnostisches Merkmal für Harnstoffbakterien verwertbar zu sein.

Glykokoll, Leuzin, Azetamid, Oxamid, Succinimid, Harnsäure und Urethan, ferner Kreatin, Kreatinin; Guanidin, Thioharnstoff und Cyanursäure sind als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle nicht verwertbar; die erste Gruppe von Glykokoll bis Urethan vermochte selbst bei Gegenwart von Fleischextrakt nicht das Wachstum zu fördern, die zweite Gruppe von Kreatin bis Cyanursäure ermöglichte auch auf Zusatz von Dextrose noch keine Bakterienentwicklung.

Kapitel 4.

Biophysikalische Eigenschaften. Verhalten der Morphoden gegen äußere Einflüsse: Temperatur, Sauerstoff, Gifte und Säuren.

Kardinalpunkte der Temperatur für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Temperaturminimum für Entwicklung:

Da die Bestimmung des Minimums keine besondere differentialdiagnostische Bedeutung hat, so wurde der Grenzpunkt der Entwicklung bei niedriger Temperatur nur annähernd festgestellt. Eine Woche bei etwa 3° aufbewahrte Kultur (Nährboden Ammon-Agar) zeigte keine Entwicklung; diese trat jedoch nachträglich wieder ein, als die Kultur bei 28° gezüchtet wurde. Eine andere Kultur wurde auf Ammon-Agar bei etwa 5° C zu züchten versucht; nach einer Woche war auch eine schwache Entwicklung eingetreten. Das Temperaturminimum der Entwicklung liegt also etwa zwischen 3° und 5°.

Temperaturoptimum für Entwicklung von Spore zu Spore:

Ich verfolgte, von Sporen ausgehend, die Entwicklung bis zum Auftreten der ersten reifen Spore bei den Temperaturen 28°, 32° und 35° C und sah die Temperatur als das Optimum an, bei welcher der Entwicklungsgang von Spore zu Spore zuerst beendet war. Diese Methode schließt den empfindlichsten Vorgang der Kulturentwicklung: die Sporenbildung ein. Zu den Versuchen wurde Ammon-Agar benutzt, der sich als Kulturboden am besten bewährt hatte.

Die erste reife Spore wurde zuerst auf den Ammon-Agarkulturen gebildet, die bei 32° gezüchtet waren und zwar wurden dazu 3 Tage benötigt, während bei den anderen Kulturen die Entwicklungsreife (d. h. reife Sporen) erst am 4. Tage beobachtet wurde.

Es war auch bei den durch die Züchtung auf 32° erwärmten Kulturen das Kondenswasser zuerst getrübt und der Wachstumsbelag auf der Agaroberfläche zuerst zu sehen.

Das Temperaturoptimum für Entwicklung von Spore zu Spore liegt also unter den angegebenen Bedingungen zwischen 28° und 35°, bei etwa 32°.

Maximum für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Die Bestimmung der Maxima hat einen großen differentialdiagnostischen Wert, vorausgesetzt, daß man die Versuchs- und Kulturbedingungen genau festlegt. Selbstverständlich kommt als solche Bedingung auch die Vorbehandlung in Betracht. So kann man z. B. beobachten, daß Formen, die durch Kultur auf ungünstigen Nährböden ohnehin geschwächt werden, oder solche, die schon vor der zur Ausführung des Versuches erfolgten Überimpfung geschwächt waren, ein niedrigeres Maximum zeigen, als nicht geschwächte.

Maximum der Sporenkeimung:

Zur Bestimmung des Temperaturmaximums impfte ich eine größere Öse voll reifen Sporenmaterials in ganz wenig steriles Wasser, kochte einige Sekunden wie gewöhnlich ab und übertrug dann die Mischung auf Nährboden; ich nahm Agarnährböden, goß zuvor das Kondenswasser aus, und untersuchte dann nach mehreren Stunden in der am Boden der Agaroberfläche angesammelten Flüssigkeitsmenge nach gekeimten oder im Keimen begriffenen Sporen. Die Keimung war zuweilen nur schwer zu sehen, zumal wenn sehr wenig Sporenmaterial zugegen war oder sich die wenig lichtbrechenden Stäbchen stark bewegten; in solchen Fällen leistete mir eine Färbung mit Fuchsinlösung oder Methylenblaulösung gute Dienste.

Resultat: Wiederholt auf Ammon-Agar angesetzte Versuche ergaben, daß die Sporen von normal vorbehandelten, auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturen bei 45° noch keimten, dagegen bei 46° und 47° nicht mehr keimten. Sporen einer durch mehrere Generationen auf Kartoffel-Kreideboden gezüchteten Kultur keimten, auf Ammon-Agar gebracht, auch bei 46° noch vereinzelt aus, dagegen nicht mehr bei 47°.

Das Temperaturmaximum für die Sporenkeimung liegt also unter den angegebenen Bedingungen zwischen 45° und 47° C.

Temperaturmaximum für Oidienwachstum:

Die Feststellung, ob bei einer maximalen Temperatur noch eine Vermehrung der eingeimpften oder durch Keimen der Sporen entstandenen Zellen stattfindet, kann eigentlich exakt nur durch Zählen in der Zählkammer erfolgen; ich begnügte mich damit, festzustellen, ob makroskopisch noch eine ganz schwache, mikroskopisch noch eine deutliche Vermehrung zu beobachten war.

Resultat: 1. Versuch bei 43°. Sowohl Sporen wie junge Stäbchen normal vorbehandelter Kulturen wurden auf Ammon-Agar gebracht und bei 43° gezüchtet; es trat mikroskopisch wie makroskopisch sichtbare Entwicklung ein. Das Wachstum war allerdings wesentlich schwächer und trat auch später ein als bei 28°. Viele Stäbchen waren dünn und machten einen geschwächten Eindruck, Sporenbildung trat selbst nach vierwöchentlichem Stehen bei 43° nicht ein.

2. Versuch bei 44°. Es wurde dasselbe Impfmaterial wie in dem vorigen Versuch benutzt. Nach 12 Stunden wurde auf Ammon-Agar bei 44° vereinzelt Keimung der übergeimpften Sporen beobachtet. Nach längerem Stehen bei dieser Temperatur trat zwar Vermehrung ein, aber auch eine

sehr weitgehende Schwächung. Sporenbildung wurde ebenfalls nicht mehr beobachtet.

3. Versuch bei 45° (dasselbe Impfmaterial). Es trat zwar Keimung der übergeimpften Sporen z. T. ein, aber es fand weder ein makroskopisch noch ein mikroskopisch sichtbares Wachstum statt.

Das Temperaturmaximum für das Oidienwachstum liegt also demnach unter den angegebenen Bedingungen zwischen 44° und 45°.

Temperaturmaximum der Sporenbildung:

Die Bestimmung des Temperaturmaximums für die Ausbildung der Sporen macht keine Schwierigkeiten; darauf ist nur zu achten, daß man die auf Sporenbildung zu untersuchenden Kulturen nach der Entfernung aus dem Wärmeschrank sofort untersucht und event. wieder sofort in diesen zurückstellt, nicht aber dazwischen längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen läßt.

Resultat: Sowohl Sporen wie junge Stäbchen normal vorbehandelter Kulturen wurden auf Ammon-Agar bei 42° gezüchtet. Die Entwicklung war deutlich, aber verzögert und geschwächt. In einem Falle, in dem von Sporenimpfmaterial ausgegangen wurde, war nach 5 Tagen makroskopisch auf der Oberfläche des Ammon-Agars ein dünner Belag gebildet, mikroskopisch waren neben normalen Stäbchen viel dünne, augenscheinlich geschwächte Stäbchen gebildet, nur vereinzelt wurde Sporenbildung beobachtet. Die Sporenbildung war selbst nach dreiwöchentlichem Stehen bei 42° noch recht schwach, wurden diese Kulturen aber noch längere Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so trat nachträglich wieder reichliche Sporenbildung ein; die Sporangien hatten dabei eine Form wie sie sonst seltener beobachtet worden war (Fig. 31—32). Hemangienbildung trat nur vereinzelt ein.

Alle Kulturversuche bei höheren Temperaturgraden setzen gute Feuchtigkeit sowohl im Nährboden wie im Wärmeschrank voraus, denn es ist sehr wohl denkbar, daß Resultate, die den Einfluß der Temperatur zeigen sollen, viel mehr den Einfluß des Wassermangels zeigen können, wenn nicht von vornherein für genügend Feuchtigkeit gesorgt ist und so der starken Verdunstung bei höherer Temperatur Rechnung getragen wird.

Gesamtresultat:	Kardinalpunkte der Temperatur		
	für Sporenkeimung zwischen	Oidienwachstum zwischen	Sporenbildung zwischen
Minimum	3—5°	3—5°	3—5°
Optimum	28—35°	28—35°	28—35°
Maximum	45—47°	44—45°	42—43°

Kardinalpunkte der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Die Bestimmung der Kardinalpunkte wurde mit Hilfe der Apparate zur Kultivierung unter verminderter Sauerstoffspannung (A. Meyer, 1905) und unter erhöhter Sauerstoffspannung (A. Meyer, 1906) vorgenommen; siehe auch die Zusammenstellung dieser Methoden bei Bredemann (1909. p. 27 ff.).

Um das Eindringen von Pilzhyphen in die Kulturröhrchen zu vermeiden (s. Bredemann, 1909. p. 69), wurden die Wattepfropfen nach dem Abbrennen ihres aus dem Röhrchen hervorragenden Teiles mit einigen Tropfen einer 1-proz. Lösung von Salicylsäure in absoluten Alkohol getränkt, die Kulturen ganz kurze Zeit bis zur Verdunstung des Alkohols beiseite gestellt und dann erst in die Kulturapparate gebracht.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Als Impfmaterial dienten in allen Fällen ausgereifte Sporen, die ¼ Minnute bei 100° erhitzt worden waren. Als Nährboden wurde, wenn nichts anderes bemerkt ist, Ammon-Agar verwendet. Die Kulturversuche unter verminderter Sauerstoffspannung wurden bei 28°, die unter erhöhter Sauerstoffspannung teils bei 28°, teils bei Zimmertemperatur (i. D. 17°) gemacht.

a) Minimum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Versuch 1. Sauerstoffgehalt: 0 mg Sauerstoff im Liter.

Es trat hier, wie auch in Kontrollversuchen selbst nach 14-tägigem Stehen keine Entwicklung ein; beim Stehen an der Luft trat dagegen nachträglich, wenn auch geschwächt, Sporenkeimung ein und Wachstum. Der sauerstoffreie Raum war dadurch erzielt worden, daß kräftige Kulturen von Bacillus asterosporus mit den zu untersuchenden Kulturen in das Kulturvakuum kamen, das dann möglichst weit ausgepumpt wurde; als Reagens auf Sauerstoff dienten Leuchtbakterien, die vor dem Einstellen in den Kulturapparat deutliches Leuchten gezeigt hatten, nach 1 bis 2 Tagen langer Züchtung unter den angegebenen Verhältnissen durchaus nicht mehr leuchteten.

Versuch 2. Sauerstoffgehalt: 1 mg Sauerstoff im Liter.

Auch hier das gleiche Resultat wie in Versuch 1: Keine Entwicklung bei dieser verminderten, dagegen nachträgliches Wachstum bei der gewöhnlichen Sauerstoffspannung in Luft.

Versuch 3. Sauerstoffgehalt: 4 mg Sauerstoff im Liter.

Ein Belag war nach 10-tägiger Kultur nicht zu entdecken, dagegen wurde vereinzelt Sporenkeimung beobachtet; die Keimstäbchen machten einen stark geschwächten Eindruck.

Versuch 4. Sauerstoffgehalt: 10 mg Sauerstoff im Liter.

Nach 14-tägiger Kultur zeigte sich makroskopisch ein dünner Belag, das Kondenswasser war schwach getrübt. Mikroskopisch waren normale wie geschwächte Stäbchen und vereinzelt auch Sporangien vorhanden.

Versuch 5. Sauerstoffgehalt: 15 mg Sauerstoff im Liter.

Nach zwei Tagen wurde Sporenkeimung beobachtet; die Kulturen zeigten ungefähr dasselbe Bild wie in Versuch 4, nur das Wachstum war etwas kräftiger.

Versuch 6. Sauerstoffgehalt: 20 mg Sauerstoff im Liter.

Nährboden: $^1/_2$ D-Agar + 0,25 Proz. Na_2CO_3.

Nach fünf Tagen war ein schwacher, aber doch deutlicher Belag gebildet, mikroskopisch waren ebenfalls viele normale Oidien und einige Sporenanlagen vorhanden.

Das Minimum der Sauerstoffspannung liegt also bei den angegebenen Nährbedingungen und 28° nach diesen Versuchen für

Sporenkeimung	zwischen	1—4	mg	nahe	bei	4	mg	im	Liter
Oidienwachstum	„	4—10	„	„	„	4	„	„	„
Sporenbildung	„	4—10	„	„	„	10	„	„	„

b) Maximum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Versuch 1. Sauerstoffgehalt = 15 Atmosphären O.

Nach 14-tägigem Stehen bei 17° (i. D.) konnte keine Entwicklung beobachtet werden; das nachträglich bei gewöhnlicher Sauerstoffspannung eintretende Wachstum machte einen sehr geschwächten Eindruck.

Versuch 2. Sauerstoffgehalt = 10 Atmosphären O.

In der 14 Tage alten Kultur wurde ganz vereinzelt Sporenkeimung beobachtet, ein Wachstum war aber nicht eingetreten bei dieser erhöhten Sauerstoffspannung.

Versuch 3. Sauerstoffgehalt = 5 Atmosphären O.

Die Kulturen zeigten nach 8-tägiger Züchtung bei 28° folgendes: Das Kondenswasser war nur ganz schwach getrübt, ein Belag kaum zu sehen; Sporenkeimung war vorhanden, auch wurden vereinzelt Schwärmoidien, aber keine Sporen oder Sporenanlagen beobachtet.

Das Maximum der Sauerstoffspannung liegt also demnach bei den angegebenen Bedingungen für

Sporenkeimung	zwischen	10—15	Atmosphären	Sauerstoff
Oidienwachstum	„	5—10	„	„
Sporenbildung	„	1—5	„	„

c) Optimum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung.

Das Optimum wurde nicht bestimmt; die Kulturen wuchsen in Luft sehr gut; die Entwicklung der Kolonien fand am kräftigsten auf der Oberfläche des Substrates statt.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß bei gewöhnlicher Sauerstoffspannung (= 276 mg O im Liter) die günstigsten Bedingungen für die Entwicklung gegeben sind, daß das Optimum der Sauerstoffspannung also sehr wahrscheinlich für Sporenkeimung, Oidienwachstum und Sporenbildung bei 276 mg O liegt.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Temperaturen von 100° und 80° C.

Die Bestimmung der Sporentötungszeiten bei 100° und 80° C wurde so ausgeführt, wie es im „Praktikum der botanischen Bakterienkunde" (Meyer, 1903. p. 128—131) und auch bei Bredemann (1909. p. 26) angegeben ist.

Als Impfmaterial dienten ausgereifte Sporen normal vorbehandelter Kulturen; als Nährboden Ammon-Agar. Die Kulturen wurden nach der Impfung mit dem abgekochten Sporenmateriale bei 28° gezüchtet.

Die Resultate der Versuche sind aus der kleinen Tabelle zu ersehen. + bedeutet Entwicklung, — keine Entwicklung.

Sporentötungsversuche bei 100° C:

5	Min.	+	10½	Min.	+	13	Min.	—
6	„	++	11	„	— +	14	„	—
7	„	++	11½	„	+	15	„	—
8	„	++	12	„	— — +	16	„	—
9	„	++	12½	„	— —	25	„	—

Das Maximum der Sporentötungszeit liegt somit bei 100° zwischen 11½ und 12½ Minuten.

Sporentötungsversuche bei 80° C:

1½	Stunden	+	3½	Stunden	+	7	Stunden	+
2	„	+	5	„	+	9	„	++
2½	„	+	5¾	„	+	9¼	„	—
3	„	+	6	„	+	10	„	—

Das Maximum der Sporentötungszeit liegt somit zwischen 9 und 9¼ Stunden.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Säuren und Giftlösungen.

Zur Bestimmung der Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Säuren und Giftlösungen wurde ein einfaches Verfahren angewendet, das sich in folgender Ausführung sehr bewährte.

Die gut ausgereiften, mindestens 4 Wochen alten Sporen einer normal vorbehandelten Kultur werden in ½ ccm sterilen Wassers verteilt, sodann in Spitzgläschen (Zentrifugierröhrchen) mit 5 ccm einer Säure oder Giftlösung bestimmter Konzentration versetzt und bei 28° aufbewahrt. In kurzen Zeitabständen, z. B. alle 30, 60 oder mehr Minuten wird die Mischung eine Minute lang umgeschüttelt oder besser nur umgeschwenkt. Nach bestimmten Zeitabständen, wie es die Art der Lösungen und ihre Konzentration bedingen, wird die Mischung bis zur völligen Klärung zentrifugiert, an Stelle der Säure oder Giftlösung, die durch vorsichtiges Aufsaugen mit der Pipette vom Niederschlage entfernt wird, 5 ccm steriles Leitungswasser zugefügt, nach dem Umschwenken wieder zentrifugiert und dieses Auswaschverfahren so oft — meist genügt fünfmaliges Auswaschen — wiederholt, bis sich auf einfachem chemischem Wege keine wesentlichen Spuren des ursprünglichen Zusatzes mehr nachweisen lassen. Eine Öse des durch das Zentrifugieren gewonnenen Sporenrückstandes überträgt man schließlich auf optimalen Nährboden, züchtet die Kulturen bei optimaler Temperatur und optimalen Sauerstoffbedingungen und verfolgt das Wachstum oder besser noch die Sporenkeimung.

Eine Wachstumshemmung, durch etwa im Sporenmateriale zurückgebliebene Gift- oder Säurereste hervorgerufen, kommt bei dieser Methode, sorgfältige Ausführung vorausgesetzt, kaum in Betracht.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Schwefelsäure.

Konzentration der Schwefelsäure: 16 Proz. ($1 + 5\ H_2O$).

Impfmaterial: Sporen der 25. Kulturgeneration.

Versuch 1. Die Einwirkungsdauer der Schwefelsäure auf die Sporen betrug 20 Minuten bei 28°.

Nach 15 Stunden waren mikroskopisch schon vereinzelte Schwärmoidien und nach weiteren 24 Stunden auch makroskopisch ein deutlicher Belag und mehrere Einzelkolonien vorhanden.

Versuch 2. Die Einwirkungsdauer der Schwefelsäure auf die Sporen betrug 35 Minuten bei 28°.

Keimung, wie Wachstum und Sporenbildung waren etwas verzögert; so waren nach 6 Tagen zwar ein deutlicher Belag und mikroskopisch auch viel Schwärmoidien zu sehen, aber noch keine Sporangien vorhanden. Das Sporenbildungsvermögen war jedoch nicht geschwächt, denn die Kultur zeigte, mehrere Monate später untersucht, einen großen Reichtum an Sporen und Sporangien, auch der Wachstumsbelag auf dem Nährboden war nachträglich noch sehr stark geworden.

Versuch 3. Einwirkungsdauer 50 Minuten bei 28°.

Nach 2 Tagen war eine ganz schwache Trübung des Kondenswassers und nach weiteren 8 Tagen ein schwacher Belag auf dem Ammon-Agar zu beobachten; die Stäbchen machten einen geschwächten Eindruck und enthielten keine Sporen; nach einigen Monaten war der Belag etwas kräftiger geworden, auch waren vereinzelt Sporen gebildet.

Versuch 4. Einwirkungsdauer 105 Minuten bei 28°.

Es trat selbst nach monatelanger Züchtung kein Wachstum ein.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Salzsäure.

Impfmaterial: Sporen der 25. Kulturgeneration.

Versuch 1. Konzentration der Salzsäure 15—16 Proz.

Einwirkungsdauer: 10 Minuten bei 28°.

Nach 15 Stunden waren mikroskopisch Schwärmoidien und nach weiteren 24 Stunden auch makroskopisch ein deutlicher Belag und einige Einzelkolonien zu sehen. Mehrere Monate später untersucht, zeigte die Kultur einen kräftigen Bakterienbelag und mikroskopisch sehr viel Sporen.

Versuch 2. Konzentration der Salzsäure 25 Proz.

Einwirkungsdauer: 40 Minuten bei 28°.

Selbst nach monatelanger Züchtung trat keine Entwicklung auf Ammon-Agar ein.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Zinksulfatlösung.

Konzentration der Lösung: 1 Mol. = 287,4 g in 1000 ccm Wasser.

Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 30. Kulturgeneration.

Versuch 1. Die Einwirkungsdauer der Zinklösung betrug 8 Stunden bei 28°.

Aus den Sporen, auf Ammon-Agar übergeimpft, entstand eine Kultur, die makroskopisch wie mikroskopisch den Eindruck einer geringen Schwächung machte. Zellen dieser 2 Wochen alten Kultur wurden mehrmals hintereinander alle 24 Stunden auf frischen Ammon-Agar übertragen und schon nach drei Übertragungen ein Material erhalten, das sich bezüglich des Wachstums und der Sporenbildung völlig normal verhielt.

Versuch 2. Die Einwirkungsdauer der Zinklösung auf die Sporen betrug 3 Wochen bei Zimmertemperatur (im Durchschnitt 17°).

Nach fünftägiger Kultur auf Ammon-Agar bei 28° war makroskopisch ein deutlich sichtbarer Belag vorhanden, der von dem normalen Bild kaum abwich; auch mikroskopisch war keine sehr deutliche Schwächung vorhanden: es waren allerdings neben normalen Stäbchen, auch dünnere, längere, sowie vereinzelt Fäden vorhanden; reife Sporen wurden erst nach 6 Tagen beobachtet, während sie sonst schon nach 4 Tagen gebildet waren. Die nach Monaten nochmals untersuchte Kultur enthielt aber doch sehr viel Sporen, wenn auch einzelne überraschend klein waren.

Also demnach waren die Sporen selbst nach dreiwöchentlicher Berührung mit nahezu 30 Proz. Zinksulfatlösung nicht wesentlich geschwächt, geschweige denn getötet.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Kaliumdichromatlösung.

Konzentration der Lösung: ½ Mol. = 143 g in 1000 ccm H_2O.

Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 30. Kulturgeneration.

Versuch 1. Die Einwirkungsdauer der Kaliumdichromatlösung dauerte 4 Tage bei 28°.

Eine Schwächung war kaum festzustellen: Sporenkeimung, Wachstum und Sporenbildung waren etwas verzögert, traten aber nachträglich kräftig ein, so daß in der monatealten Kultur fast nur Sporen vorhanden waren.

Versuch 2. Die Einwirkungszeit der Kaliumdichromatlösung betrug 8 Tage bei 28°.

Eine geringe Schwächung zeigte sich bei der aus den Sporen entstandenen Kultur und äußerte sich in Verzögerung des Entwicklungsganges und in der vereinzelten Ausbildung von Fäden, wie der Neigung der Oidien zur Fadenbildung; wurden junge Oidien auf frischen Ammon-Agar übertragen, so zeigt sich völlig normales Wachstum. Die aus den Sporen erwachsene Kultur zeigte nach monatelangem Stehen fast nur Sporen.

Eine 14-proz. Lösung von Kaliumdichromat wirkt demnach selbst nach achttägiger Einwirkung kaum schwächend auf die Sporen von Bacillus probatus.

Widerstandsfähigkeit der Oidien gegen Giftlösungen.

Die Bestimmung der Widerstandsfähigkeit der Oidien gegen Giftlösungen wurde zu dem Zwecke gemacht, ein weiteres differentialdiagnostisches Merkmal für Bakterien zu finden; beobachtet wurde dabei die Wachstumshemmung, welche durch das im Nährboden verteilte Gift hervorgerufen wurde.

Als Giftlösungen wurden sterile Lösungen von Zinksulfat 0,1-proz. und Karbolsäure 0,1-proz. angewendet, als Nährboden je 5 ccm Ammon-Agar und als Versuchsmaterial junges, kräftiges Stäbchenmaterial einer 24 Stunden alten, auf Ammon-Agar erwachsenen Kultur. Die Versuchstemperatur betrug wie gewöhnlich 28° C.

Ausführung der Versuche.

1. Versuche mit Zinksulfat: Von der Zinksulfatlösung wurden 1 bis 15 Tropfen je einem Röhrchen mit geschmolzenem Ammon-Agar zugesetzt, so daß in das erste Röhrchen ein, in das zweite zwei, in das dritte drei Tropfen der Zinklösung kamen und so fort. Die Tropfen wurden mit dem im Handel befindlichen Normal-Tropfenzähler nach Kunz-Krause (zu beziehen von Hugershoff, Leipzig, Fig. 1) abgemessen, dessen Abtropffläche so eingerichtet ist, daß 20 Tropfen Wasser von 15° einem Gramm Wasser entsprechen. Statt dieses Normal-Tropfenzählers kann man auch das neuerdings von der Firma Wenderoth, Kassel, empfohlene Normal-Tropfglas (Fig. 2) verwenden. Die Giftlösungen können in diesen Gläschen direkt sterilisiert werden; die zu erzielenden Tropfen sind gleich groß und schwer und wiegen bei diesen ganz verdünnten wäßrigen Giftlösungen kaum mehr als bei reinem Wasser (= 0,05 g bei 15°). Die mit den Giftlösungen versetzten Agarröhrchen läßt man schräg erkalten.

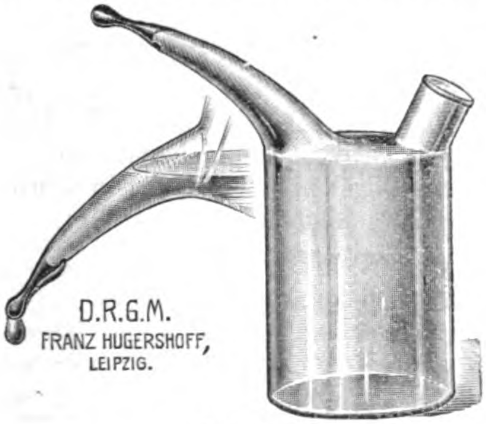


Fig. 1.

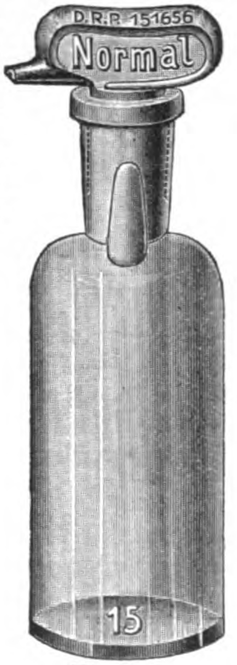


Fig. 2.

Resultat: In den mit 10 und mehr Tropfen Zinksulfatlösung versetzten Agarröhrchen war nach Strichüberimpfung des normalen Stäbchenmaterials weder ein makroskopisches, noch ein mikroskopisches Wachstum zu sehen; in dem mit 9 Tropfen versetzten Ammon-Agar war mikroskopisches, in dem mit 8 Tropfen versetzten auch makroskopisch sichtbares Wachstum eingetreten; diese Kulturen machten aber einen stark geschwächten Eindruck, die Stäbchen waren dünn, neigten zur Fadenbildung und enthielten keine Sporen. Bei dem mit 7 Tropfen Zinksulfatlösung versetzten Ammon-Agar konnte noch vereinzelte Sporenbildung neben normalen und geschwächten Stäbchen beobachtet werden. Die mit 1—6 Tropfen versetzten Kulturen zeigten vorwiegend normales Material.

Die Wachstumshemmung erfolgte also in 5 g bei 28° gezüchtetem Ammon-Agarnährboden durch 10 Tropfen, die Hemmung der Sporenbildung durch 8 Tropfen einer 0,1-proz. Zinksulfatlösung. Umgerechnet:

Hemmung des Wachstums auf Ammon-Agar durch 0,01 Proz. Zinksulfat.
„ der Sporenbildung auf Ammon-Agar durch 0,008 Proz. Zinksulfat.

2. Versuche mit Karbolsäure (0,1-proz. sterile Lösung).

In der eben geschilderten Weise wurde auch die Karbolsäurelösung in abgezählten Tropfen den Ammon-Agarröhrchen, je 5 g Nährboden vor der Strichüberimpfung des 24-stündigen Stäbchenmaterials zugesetzt. Selbst auf Zusatz von 30 Tropfen Karbolsäure zu 5 g Ammon-Agar trat noch mikroskopische wie makroskopische Entwicklung ein, Sporenbildung wurde noch beobachtet in der mit 20 Tropfen der 0,1-proz. Karbolsäurelösung versetzten Kultur.

Es erfolgte keine Hemmung des Wachstums auf Ammon-Agar durch 0,03 Proz. C_6H_5OH.

Kapitel 5.

Biochemische Eigenschaften. Stoffwechselprodukte, Enzyme.

(Eiweißabbau.)

Tryptophan = Proteïnochrom.

Bildung: Nach den Untersuchungen von Erdmann und Winternitz (Münchener med. Wochenschr. Bd. 23. 1903. p. 982) und H. Winternitz (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16) sind sehr viele Bakterienspezies zur Tryptophanbildung befähigt. Die Autoren benutzten vorwiegend pathogene Formen; bei den nichtpathogenen Spezies, die in 5-proz. Peptonbouillon gezüchtet worden waren, wurde folgendes festgestellt:

Namen der Spezies	Zeitpunkt des Eintrittes der Reaktion
Bac. acidi lactici (?)	—
Bac. megatherium (?)	nach 5 Tagen
Bac. prodigiosus	„ 4 „
Bac. subtilis	„ 3 „
Clostridium (?)	„ 3 „

Als beste Nährlösung wird 5-proz. Peptonnährbouillon empfohlen; auch 3-proz. Peptonwasser mit 0,5 Proz. NaCl soll in den wenigen Fällen, in denen es ein Bakterienwachstum ermöglicht, seiner hellen Eigenfärbung wegen zur Beobachtung der Farbreaktion recht brauchbar sein.

10 ccm der Nährlösung werden mit reichlichen Mengen geimpft, beim Temperaturoptimum aufbewahrt und täglich untersucht.

Nachweis: Die Nährlösung wird mit Essigsäure schwach angesäuert und tropfenweise mit gesättigtem, frisch hergestelltem Chlorwasser versetzt oder besser noch vorsichtig mit diesem überschichtet. Der Eintritt einer rotvioletten Färbung, eines rotvioletten Ringes im Falle der Überschichtung ist beweisend für das Vorhandensein von Tryptophan. Bromwasser ist nach Kruse (1911. p. 540) brauchbar, aber nicht so gut wie Chlorwasser; dieses stellt man am zweckmäßigsten durch Übergießen von Chlorkalkwürfeln mit verdünnter Salzsäure, Einleitung des Chlors in eine Waschflasche mit wenig Wasser und weiter in ein gut schließendes, zu 2/3 mit ausgekochtem destilliertem Wasser von 10—15° C angefülltes Gefäß bis zur Sättigung.

Variabilität der Tryptophanreaktion.

Es bestehen nach Erdmann und Winternitz (1903) in dem Eintritt der Reaktion kleine Schwankungen, die jedenfalls von der jeweiligen Beschaffenheit der Kultur und den Nährbedingungen abhängen.

5-proz. Peptonbouillon wurde mit Sporen und Stäbchen von Bac. probatus geimpft und in der oben angegebenen Weise auf Tryptophan untersucht. Da jedoch das Wachstum selbst nach wochenlanger Züchtung bei 28° makroskopisch kaum sichtbar war, so fielen die Prüfungen auf Tryptophan negativ aus. In 4 Wochen alter 5-proz. Peptonbouillon, die noch mit 0,2 Proz. Ammonkarbonat versetzt worden war, konnte ebenfalls kein Tryptophan nachgewiesen werden, obwohl hier das Wachstum stärker war. Die Versuche sind also bei Bac. probatus zweckmäßiger mit Peptonbouillon anderer Zusammensetzung, in der die Bakterien besser wachsen, zu wiederholen.

Indol. Bildung und Nachweis.

Die Prüfung auf Indol wurde in 4 Wochen alter 5-proz. Peptonbouillon vorgenommen; das Wachstum der eingeimpften Sporen und Stäbchen war in dieser Nährlösung trotz eines Zusatzes von 0,2 Proz. Ammonkarbonat nicht kräftig.

Diese Bouillon und ihr Destillat wurden nun mit den üblichen (siehe Kruse, 1910, Löhnis, 1910) Indolreagentien auf Indol geprüft.

Es trat jedoch nur bei Anwendung der Ehrlichschen Reaktion ein positives Resultat ein; die hier beobachtete Rotfärbung war zwar deutlich, aber doch nur ganz schwach. Weitere vergleichende Versuche ergaben übereinstimmend mit anderen Angaben (siehe z. B. Telle und Huber, 1911; auch Rochaix et Dufourt, 1910), daß die Reaktion von Ehrlich weitaus die schärfste Reaktion auf Indol ist.

Schwefelwasserstoff. Bildung und Nachweis.

Die Schwefelwasserstoffbildung wurde in 5-proz. Peptonbouillon verfolgt. Am Wattepfropfen war ein mit Bleiessig getränkter Fließpapierstreifen befestigt, der in den Kolben, aber nicht in die Flüssigkeit hineinreichte. Das Wachstum der Bakterien war jedoch in dieser Lösung recht schlecht, eine Schwärzung des Bleipapiers wurde innerhalb 8 Tagen nicht beobachtet. Dagegen trat auf Zusatz von Säure zu 4 Wochen Harnstoffbouillonkultur sofort Schwefelwasserstoffbildung auf; das über das Röhrchen gehaltene feuchte Bleipapier wurde deutlich braunschwarz gefärbt. In gleicher Weise wurde dann auch in 4 Wochen alter, Nährlösung 1 enthaltender Kultur Schwefelwasserstoffbildung nachgewiesen. Der Säurezusatz war nötig, um den Schwefelwasserstoff frei zu machen, der sich mit dem in der Flüssigkeit vorhanden gewesenen Ammoniak zu Schwefelammonium verbunden hatte. (Die Methode des Schwefelwasserstoffnachweises wurde von Petri und Maassen [1893] angegeben.)

Riechstoffe. Trimethylaminbildung.

Die Bildung von Riechstoffen unter bestimmten Nährbedingungen kann bis zu gewissem Grade kennzeichnend sein, zumal bei Feststellung der Art des Riechstoffes, für die Bakterienspezies und ist daher bei der Artbeschreibung zu beachten.

In allen peptonhaltigen Kulturen, besonders aber in Bouillon mit Harnstoff oder Ammoniumkarbonatzusatz trat nach Impfung mit Bac. pro-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

batus schon nach einigen Tagen ein unangenehm fauliger Leimgeruch auf, der mit dem Alter der Kultur noch an Stärke zunahm.

Zur näheren Untersuchung des Riechstoffes wurde eine Bouillonkultur, die 5 Proz. Pepton und 0,2 Proz. Ammonkarbonat enthielt und mit Sporen der 40. Kulturgeneration geimpft worden war, nach vierwöchentlicher Züchtung bei 28° benutzt. Diese Kultur zeigte einen starken Geruch nach Heringslake, der weder nach 5 Minuten langem Kochen im Reagensglase, noch auf Zusatz gleicher Mengen 5-proz. Schwefelsäure ganz verschwand. Die Bouillon wurde der Destillation unterworfen und das Destillat, das den bezeichnenden Geruch noch deutlicher zeigte, mit Salzsäure im Überschusse versetzt: der Geruch wurde schwächer, trat aber auf Zusatz von viel Kalilauge wieder deutlich hervor. Geruchsproben, die ich zum Vergleiche noch mit reinem Trimethylamin ausführte, machten die Bildung von Trimethylamin als auffälligen Riechstoff sehr wahrscheinlich.

Für diese Annahme sprechen auch die Versuche von Takeda, auf die mich Herr Prof. Kutscher aufmerksam machte. Takeda (1909. p. 86—88) fand in Übereinstimmung mit einer Notiz in Hoppe-Seylers Handbuch der chemischen Analyse (p. 203), daß bei der ammoniakalischen Gärung des Harns Trimethylamin frei wird. Takeda beschreibt folgende Versuche: „Ich überließ 1 l Menschenharn, in dem sich nach einer Kontrollprobe kein freies Trimethylamin fand, einen Monat der ammoniakalischen Gärung, dann destillierte ich ihn im Vakuum mit Magnesiumoxyd. Das Destillat lieferte mit Goldchlorid eine nicht unbeträchtliche Fällung von Trimethylamingoldchlorid. Die Tatsache, daß bei der ammoniakalischen Gärung Trimethylamin frei wird, ist für die Erklärung des ‚urinösen‘ Geruchs, den man an faulendem Harn wahrnehmen kann, nicht ohne Wichtigkeit. Es ist zweifellos, daß der ‚urinöse‘ Geruch durch Ammoniak und andere bisher unbekannte Substanzen bedingt wird. Einer der unbekannten flüchtigen Körper des urinös riechenden Harns ist nunmehr im Trimethylamin gefaßt worden, das nach den Untersuchungen von Kaufmann (1908, Neurolog. Centralbl. No. 6) noch in einer Verdünnung von 1 : 2 000 000 sich der Nase bemerkbar macht.“

„Weiter untersuchte ich normalen Hundeharn, den ich einige Tage der ammoniakalischen Gärung überlassen hatte. 1 l davon wurde im Vakuum 20 Minuten mit Magnesiumoxyd destilliert. Ich erhielt aus dem Destillat 0,06 g Trimethylaminaurat. Durch die den Harn zersetzenden Bakterien war also auch hier Trimethylamin in Freiheit gesetzt worden.“

Gasbildung.

Der Nachweis der Gasbildung wurde in Gärkölbchen vorgenommen (siehe A. Meyer 1903. p. 104; dort auch Näheres über die Gasbildung in Bakterienkulturen). Es wurden Nährlösungen angesetzt:

a) Mit Kohlehydraten, wie Dextrose, Galaktose, Saccharose und Laktose. Diese sind in den Meyerschen Nährlösungen enthalten, die mit kräftigem Oidienmaterial geimpft und vor der Impfung mit Ammonkarbonat versetzt worden waren. Eine Gasbildung konnte in keinem Falle beobachtet werden.

b) Mit ameisensaurem Natrium (Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff).

Die Gasbildung: ($CO_2 + H_2$) in Fleischbouillon bei Gegenwart von ameisensaurem Natrium wird von Omelianski als differentialdiagnostisches Merkmal empfohlen (Omelianski 1905. p. 673).

Ich setzte neutraler, 0,1 Proz. Natriumkarbonat-, 0,2 Proz. Ammonkarbonat- und 2 Proz. Harnstoff-haltiger Bouillon 0,5 Proz. ameisensaures Natrium hinzu und impfte dann kräftig; in der neutralen Bouillon trat kein Wachstum ein, dagegen in allen anderen Kulturen; eine Gasbildung fand jedoch nicht statt.

Ammoniakbildung.

1. Ammoniakbildung aus dem Eiweißstoff Pepton:

Nach Marchal (1894) ist die Ammoniakbildung aus stickstoffhaltiger Substanz sehr verbreitet bei den Bakterien; nach Berghaus (1908) hat sie mit dem Wachstumsprozeß selbst nichts zu tun, sie ist vielmehr nach seiner Meinung ein Stoffwechselvorgang. Berghaus hat verschiedene Handelspeptone gefunden, die Ammoniak enthielten, ebenso Fleischextraktstoffe; der von mir untersuchte Fleischextrakt von Liebig enthielt ebenfalls kleine Mengen Ammoniak. Es ist deshalb angebracht, die Versuchslösung vor der Verwendung auf Ammoniak zu untersuchen, ferner während des Versuches die mögliche Verdunstung zu berücksichtigen oder ganz zu verhindern durch geeignete Säurevorlage.

In meinen mit Natriumkarbonat alkalisch gemachten 1 Proz. Pepton enthaltenden Bouillonkulturen konnte ich eine Ammoniakbildung nicht nachweisen. Geprüft wurde mit rotem Lackmuspapier, das am Wattepfropfen der Kulturgläser befestigt war und bis nahe an die Flüssigkeitsoberfläche heranreichte; auch auf Zusatz von Kalkmilch trat keine vorübergehende Blähung des feuchten Lackmuspapieres ein (es wurde einseitiges Postpapier der Helfenberger Fabrik benutzt).

2. Ammoniakbildung aus Nitriten und Nitraten.

Die Ammoniakbildung aus Nitriten und Nitraten durch deren Reduktion ist bekanntermaßen eine bei den Bakterien sehr verbreitete Eigenschaft.

Da ein Wachstum von Bac. probatus selbst in den mit Natriumkarbonat versetzten kaliumnitrat- oder natriumnitrathaltigen Nährlösungen nicht eintrat, führten die diesbezüglichen Versuche zu keinem Resultat. Es wäre möglich, daß in alkalischer Bouillon mit ganz geringem Zusatz eines dieser Salze nach starker Impfung ein Wachstum und damit eine Lösung der Frage zu erzielen wäre.

3. Ammoniakbildung aus Harnstoff:

Das Vermögen des Bac. probatus, den Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure zu spalten, war sehr stark entwickelt, in flüssigen, wie in festen Nährböden. Die Spaltung wurde einmal an dem recht deutlichen Ammoniakgeruch der mit Harnstoff versetzten Kulturen erkannt, weiter auch an den Ausscheidungen von Calciumphosphat und Calciumkarbonatkristallen (siehe Kristallbildung).

Die Versuche zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffspaltungsvermögens sind in einem besonderen Kapitel behandelt; dort finden sich auch die Methoden beschrieben.

Säure- und Alkalibildung.

(Siehe hierzu A. Meyer, 1903. p. 89.)

Die Säure- und Alkalibildungsversuche führten zu keinem Resultat, da in den benutzten neutralen, konstant zusammengesetzten Nährlösungen kein Wachstum stattfand, ebenso nicht in Nährlösung 5, der durch den Titer bestimmte Mengen von Natriumkarbonat zugesetzt waren.

Eine Säurebildung ist vermutlich auf zuckerhaltigen Nährböden, wie Nähragar oder Nährgelatine oder Nährbouillon mit Dextrosezusatz, auf Möhre und Kartoffel vorhanden, da eine deutliche Entwicklung erst auf Zusatz genügender Mengen Alkali stattfindet, das die entstehende Säure sofort wieder abstumpft. Zum Nachweis einer Säurebildung könnte man Agarnährböden mit Kreidezusatz verwenden.

Die Bildung von salpetriger Säure aus Ammoniak ist an anderer Stelle besprochen, ebenso die Bildung von Trimethylamin in peptonhaltigen Kulturen.

Nitrifikation. Oxydation des Ammoniaks zu Nitrit.

Nach den in der Literatur vorliegenden Untersuchungen (die Zusammenstellung siehe bei Löhnis 1910. p. 604 ff.) sind nur die von Winogradsky (1892) isolierten Gattungen Nitrosomonas und Nitrosococcus zur Nitritbildung aus Ammoniak befähigt. Es ist mir nun gelungen, auch für die Harnstoffbakterien diese Fähigkeit nachzuweisen.

Als Reagens auf Nitrit benutzte ich sowohl die Jodzinkstärkelösung als auch vor allem die von Dieudonné (1895), Lunkewicz (1894) und Kläser (noch nicht veröffentl. Marburger Diss.) empfohlene Grieß-Ilosvaysche Probe (Sulfanilsäure + Naphthylamin). Nitritreagens:

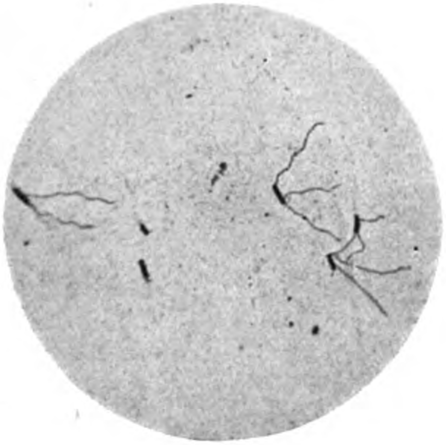
Lösung A. Sulfanilsäure 0,5 g. gelöst in Essigsäure (33 Proz.) 150 ccm.
Lösung B. Napthylamin 2,0 unter Erwärmen gelöst in Wasser 20 ccm, darauf versetzt mit Essigsäure (33 Proz.) 150 ccm.

Das Reagens ist in getrennten, luftdicht schließenden, möglichst gefüllten Flaschen aufzubewahren und hält sich dann, wie ich mich durch besondere Versuche überzeugen konnte, unverändert, während es beim Stehen an der Luft schwach bis deutlich rosarot wird. Zur Ausführung der Reaktion gießt man gleiche Teile, etwa je ½ ccm zusammen, erwärmt die Mischung und setzt dann ebensoviel von der auf Nitrit zu prüfenden Flüssigkeit hinzu. Mit diesem Reagens sollen noch 0,0002 mg Nitrit nachweisbar sein; bei sehr geringen Mengen Nitrit tritt eine schwach rötliche Färbung ein, die bei größeren Mengen von Nitrit dann immer stärker rot wird.

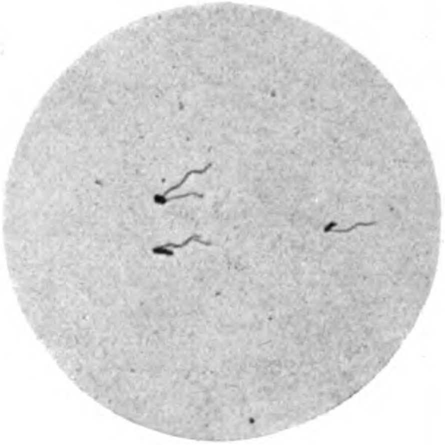
Zum Nachweis der Ammoniakoxydation und Nitritbildung benutzte ich sowohl harnstoff- wie ammonkarbonathaltige Lösungen. Eine Zusammenstellung dieser Lösungen, die neben oben genannten Stoffen und mineralischer, stickstoffreier Nährlösung gewöhnlich noch Asparagin und von Kohlenstoffquellen Dextrose oder Rohrzucker und Glyzerin enthielten, findet man auf der Tabelle VI; dort finden sich auch Angaben, mit welcher Stärke die Nitritreaktion in den einzelnen Nährlösungen auftrat. Außer diesen Kulturlösungen, die in Erlenmeyer-Kölbchen mit Watteverschluß angesetzt waren, untersuchte ich auch 2 Proz. Harnstoffbouillon, die in luftdicht verschlossenen Flaschen gezüchtet war. Alle Lösungen waren zu Beginn der Versuche völlig nitrit- und nitratfrei (wie es ja auch nach ihrer Zusammensetzung zu erwarten war). Da sich nach Rullmann (1899) während der mehrwöchigen Aufbewahrungsdauer der Kultur lösungen deutlich nachweisbare Mengen von oxydiertem Stickstoff aus der Laboratoriumsluft in den Kulturlösungen einfinden sollen, wurden auch ungeimpfte Kontrollösungen unter sonst ganz gleichen Bedingungen wie die geimpften Nährlösungen aufbewahrt und am Ende auch mit diesen zum Vergleich auf Nitrit geprüft. Da in meinen Versuchen die Nitritbildung

Centralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. 39.

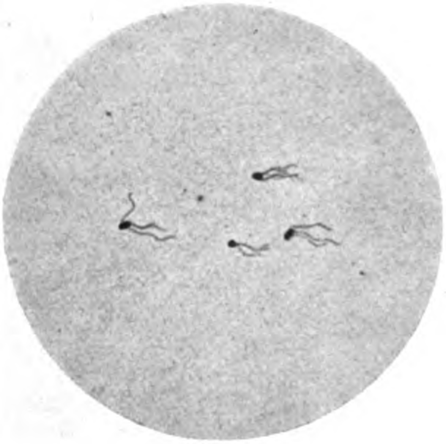
***Kellermann, McBeth, Scales** and **Smith,** Cellulose-Dissolving Bacteria.* *Plate I.*



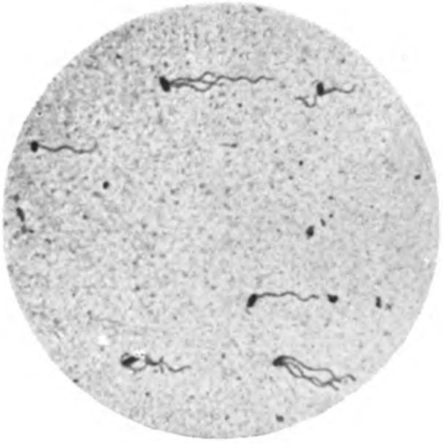
1.



2.



3.



4.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

schon in wenigen Tagen nachweisbar war, erstreckten sich die Versuche nur auf höchstens einige Wochen. Nach dieser kurzen Zeit trat in den ungeimpften Kontrollösungen nur eine schwache rosarote Färbung auf, die kaum stärker war, als diejenige, welche beim Zusammengießen des in nicht gefüllten Flaschen aufbewahrten Reagenzes zu beobachten war. Ein Zutritt von nitrithaltiger Laboratoriumsluft hatte also gar nicht oder in doch nicht deutlich nachweisbarem Maße stattgefunden; zudem war ja in den luftdicht verschlossenen Kulturen mit Harnstoffbouillon ein Zutritt von Laboratoriumsluft ganz ausgeschlossen, eine Täuschung also gar nicht möglich. In 2 Proz. Harnstoffbouillon war schon nach 3 Tagen eine deutliche Reaktion nachzuweisen, die dann bei fortschreitender Kulturentwicklung noch an Stärke zunahm; die Nitritreaktion war aber nach 8 Tagen und selbst nach 4 Wochen nicht ganz so stark, als diejenige, welche in Nährlösungen gleichen Alters, aber anderer Zusammensetzung auftrat; diese enthielten statt 2 Proz. Harnstoff nur 0,2 Proz. Harnstoff oder Ammonkarbonat, neben Asparagin und Dextrose oder Rohrzucker und Glyzerin gelöst in M-Nährlösung. Dieses Resultat überraschte mich, da ich in den Harnstoffbouillonkulturen wegen des zweifellos stärkeren Wachstums auch eine stärkere Nitritbildung erwartet hatte. Es hatte sich nämlich in allen anderen Versuchen herausgestellt, daß bei stärkerer Trübung der Lösung, folglich auch stärkerem Wachstum, eine stärkere Oxydation des Ammoniaks zu Nitrit stattgefunden hatte.

Die erwähnte Tatsache ist anscheinend so zu erklären, daß bei einer für die Nitrifikation günstigen, aber nicht übermäßigen Menge Ammoniak die Nitrifikation am stärksten verläuft.

Schleimbildung.

Schleimbildung konnte bei den Kulturen von Bac. probatus sehr häufig beobachtet werden. Besonders stark war sie in Peptonbouillon, der Harnstoff oder Ammoniumkarbonat zugesetzt worden war. Diese Flüssigkeit war zuweilen nach mehrwöchentlichem Stehen am Boden dickzähflüssig und schleimig fadenziehend; auch in Asparaginlösungen trat nach Zusatz von Harnstoff oder Ammonkarbonat nach längerem Stehen eine deutliche Schleimbildung auf. Auf Ammonagar wurde besonders nach häufigem Überimpfen ein schleimiges Wachstum beobachtet.

Mikrochemisch ließ sich mit Pelikantusche (1 + 1) eine schwache Schleimhülle nachweisen.

Die vermutlich von Schleim herrührende Rotfärbung beim Verrühren jungen Materials von Bac. asterosporus in 50-proz. wäßriger KOH-Lösung (s. A. Viehoever, 1912) blieb beim Einbringen von schleimreichem Stäbchenmaterial des Bac. probatus in KOH-Lösung gleicher Zusammensetzung und Konzentration aus.

Farbstoffbildung.

Eine deutliche Farbstoffbildung konnte nicht beobachtet werden, die auf den Nährböden sichtbaren Bakterienbeläge hatten ein weißlichgraues bis schmutzig-gelbgraues Aussehen.

Fluoreszenz und Lumineszenz.

Fluoreszenz konnte in keinem der festen oder flüssigen Nährböden bemerkt werden.

Leuchtfähigkeit war nicht festzustellen.

Kristallbildung.

Miquel (1904. p. 73) verwendet das Auftreten von Kristallen zur Erkennung und Reinzüchtung von Harnstoffbakterien in Rohkulturen. Er empfiehlt Peptongelatine mit 2—5 Proz. Harnstoff und sagt: „Einige Tage nach Anlegung der Plattenzuchten, oft sogar schon nach 24 Stunden, wird man bemerken, daß die meisten der wahrnehmbaren Kolonien mit einem Hof von hantelförmigen, in Wasser unlöslichen Kristallen umgeben sind, welche aus Karbonaten und Phosphaten des Kalkes aufgebaut und durch das im Nährboden entstandene Ammoniak langsam ausgefällt worden sind. Darum ist dieser Hof auch um so weiter ausgebreitet, je stärker das Spaltvermögen der Bakterien der Kolonie ist. Bisweilen umgibt diese Aureole von Kristallen die kleine Kolonie gleichsam als ein kreisrunder Nebel von einigen Millimetern im Durchmesser; oft aber ist die ganze Gelatineschicht binnen 24 Stunden mit solchen Kriställchen übersät. An diesem Verhalten können die Kolonien harnstoffvergärender Arten auf der Platte als solche erkannt und ohne weiteres Suchen in neuen Nährboden übertragen werden, in welchem sie dann auf ihre vermutete Fähigkeit zu prüfen sind.“

Beijerinck (1901) hebt dagegen hervor, daß die Heranziehung der Kristallbildung als Erkennungsmittel für Harnstoffbakterien wenig geeignet sei, da die Abscheidung der Kristalle erst nach vielen Stunden und auch sehr unregelmäßig erfolge, weil sie von den in der Kulturgelatine gegenwärtigen Substanzen und von anderen oft unbekannten Nebenbedingungen abhängig sei.

Löhnis (1905, 1910), der seinen Kulturen statt 2 Proz. nur 1,5 Proz. Harnstoff zusetzte, erwähnt ebenfalls die Unsicherheit der Kristallbildung.

Ich fand in Nährböden mit 0,2 Proz. Harnstoff gewöhnlich nur bei mikroskopischer Betrachtung Kristalle, bei makroskopischer Betrachtung waren sie nur selten zu bemerken. Aber alle festen und flüssigen Nährböden mit 2 und mehr Proz. Harnstoff ließen, mit Harnstoffbakterien geimpft, auch äußerlich bei kräftigem Wachstum meist schon nach 24 Stunden die Kristallbildung erkennen; diese war allerdings in dem einen Falle deutlicher als in dem anderen, bei der Durchsicht des Nährbodens event. mit Hilfe der Lupe oder des Binokulars waren sie aber immer aufzufinden. Auf festen Nährböden werden entweder größere Kristalle ausgebildet, die im Nährboden, vorwiegend aber an seiner Oberfläche, unregelmäßig verteilt sind, oder es entsteht ein ganz feiner Kristallniederschlag, welcher der Nährbodenoberfläche bei der Durchsicht ein trübes wolken- oder milchglasähnliches Aussehen gibt. Natürlich können auch beide Erscheinungen der Kristallbildung gleichzeitig nebeneinander vorkommen. In den harnstoffhaltigen Flüssigkeiten sieht man zuerst beim Umschwenken einzelne kleine längliche Kristalle aufleuchten, die mit fortschreitender Kulturentwicklung in größerer Menge entstehen und sich dann an die Glaswand oder an den Gefäßboden festsetzen und zum größeren Teile beim Ausgießen der Kulturlösung als in Wasser unlösliche Kristalle zurückbleiben. Die von stärker harnstoffhaltigen Nährböden entnommenen Bakterienbeläge enthielten mikroskopisch betrachtet eine Unmenge von vorwiegend hantelförmigen Kristallen verschiedener Größe. Die Kristalle bestehen, wie schon an anderer Stelle hervorgehoben wurde und wie auch Söhngen (1909) feststellte vorwiegend aus Calciumkarbonat und Calciumphosphat.

Da die Entstehung der Kristalle abhängig ist von der Bildung des Ammoniaks in stärker harnstoffhaltigen Kulturen, so kann die Kristallbildung

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

recht wohl als Erkennungsmerkmal für Harnstoffbakterien mit herangezogen werden.

Iriserscheinung.

Die von Beijerinck zur Erkennung von Harnstoffbakterien in Rohkulturen empfohlene Beobachtung der Iriserscheinung beruht gleichfalls auf einer Ausscheidung von Kristallen durch das im Nährboden infolge der Bakterientätigkeit freigemachte Ammoniak. Nach Beijerinck (1901) impft man die fraglichen Bakterien auf eine 2 Proz. Harnstoff enthaltende Hefewassergelatine (s. unten) über und kann dann, wenn Harnstoffbakterien zugegen sind, schon in wenigen Minuten bei den ammoniakbildenden Kolonien die Iriserscheinung beobachten; und es entsteht ein völlig amorpher Niederschlag, der sich zunächst nur ausschließlich in der Gelatineoberfläche ablagert, und zwar in so dünner Schicht, daß darin Newtonsche Farbenringe sehr schön sichtbar werden; nach einiger Zeit entsteht auch in der Tiefe der Gelatine ein amorpher, weißer Niederschlag, der infolge der Bildungsweise die Form einer plankonvexen Linse annimmt, wobei die Farbenpracht nicht verloren geht. Die Ausdehnungsschnelligkeit steht in direktem Zusammenhange mit der Intensität der Ureumspaltung, also mit der Aktivität des untersuchten Bakterienmaterials". Die Entstehung der Iriserscheinung ist nach den neueren Untersuchungen von Söhngen (1909) auf die Bildung eines sehr feinen Calciumphosphatniederschlages zurückzuführen.

Ich habe zwei Versuchsreihen mit Harnstoff-Hefewassergelatine gemacht und dabei auch den erwähnten Kristallniederschlag beobachten können, dagegen nicht immer die Farbenringe; ein Ausbleiben der Farbenringe ist also nicht beweisend für die Abwesenheit von Harnstoffbakterien und die „Iriserscheinung" somit von untergeordneter Bedeutung für die Speziesdiagnose.

Protease-Bildung = Gelatineverflüssigungsvermögen.

Zur Feststellung des Gelatineverflüssigungsvermögens und der Variation der Gelatineverflüssigung wurden folgende Nährböden hergestellt:

1. Hefewassergelatine (nach Beijerinck, 1911) + 2 Proz. Harnstoff. Hefewassergelatine ist Gelatine + ein mit 20 Proz. Preßhefe bei 100° hergestellter wässeriger Auszug.
2. D-Gelatine (Nährstoffkonzentration wie D-Agar) + 2 Proz. Harnstoff.
3. Nährgelatine (ohne Dextrose) + 0,1 Proz. Na_2CO_3.
4. Nährgelatine (ohne Dextrose) + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammonkarbonat.
5. ⅓ D-Gelatine (Nährstoffkonzentration wie ⅓ D-Agar) + 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat.

Die Nährböden enthielten alle 10 Proz. Gelatine.

Alle Kulturen wurden bei Zimmertemperatur (17° C i. D.) aufbewahrt.

1. Versuch. Nährboden: Harnstoff-Hefewassergelatine.

Impfmaterial: ¼ Minute bei 100° abgekochte Sporen von Harnst. mineralag. Am 1. 3. 1909 wurden die Hefewassergelatineplatten geimpft, am 10. 3. 1909 untersucht. Eine Verflüssigung der Gelatine war nicht eingetreten.

2. Versuch. Nährboden: D-Gelatine + 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: 6 Wochen alte, bei 100° abgekochte Sporen einer Harnstoffmineralagarkultur.

a) Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 28. 4. 1909 ist nach 24 Stunden deutlich sichtbar und am 12. 5. 1909, also nach 14 Tagen, 4—5 cm tief entwickelt. Eine Verflüssigung der Gelatine wurde nicht beobachtet.

b) Strich auf ein schräg erstarrtes Gelatineröhrchen am 28. 4. 1909, nach 24 Stunden deutlich entwickelt und etwas rhizoidenartig in die Gelatine gewachsen; eine Verflüssigung trat auch nach 14 Tagen nicht ein.

3. Versuch. Nährboden: Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Impfmaterial: 24-stündige Oidien einer ⅓ D-Agar + 0,1-proz. Na_2CO_3-Kultur.

Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 15. 9. 1910 ist nach 24 Stunden 2 cm tief, nach 6 Tagen, am 21. 9. 1910, 6 cm tief vorgedrungen, die Gelatine aber ist nicht verflüssigt.

4. Versuch. Nährboden: Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Impfmaterial: 24-stündiges, auf Ammon-Agar gewachsenes Oidienmaterial.

Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht am 8. 2. 1911 ist nach nahezu 3 Wochen bis auf den Boden vorgedrungen unter Ausbildung sternförmig vom Stich sich verzweigender Kolonien. Verflüssigung hatte nicht stattgefunden.

5. Versuch. Harnstoff-Hefewassergelatine.

Impfmaterial: 24-stündiges, auf Ammon-Agar gewachsenes Oidienmaterial.

Das am 5. 10. 1911 auf die Gelatineplatte durch Strich übertragene Bakterienmaterial zeigte nach 11 Tagen, am 16. 10., deutliche, wenn auch schwache, Verflüssigung.

6. Versuch. Nährboden: Nährgelatine + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammoniumkarbonat.

Impfmaterial: 24-stündiges, auf Ammon-Agar gewachsenes Oidienmaterial.

a) Der Stich in die 8 cm hohe Gelatineschicht vom 5. 10. 1911 war am 16. 10. 1911 4 cm tief vorgedrungen, zeigte auf der Oberfläche einen schwachen Belag und im Innern einen rübenförmigen, wolkigen oder schleierartigen Wuchs. Eine Verflüssigung wurde nicht beobachtet, auch nach weiteren 5 Tagen nicht. Am 6. 11. 1911 war dagegen die Gelatine erweicht an der Oberfläche, zeigte eine trichterförmige Einsenkung, in deren Boden sich etwa 0,2 ccm verflüssigte Gelatine angesammelt hatte. Bei der Durchsicht waren Kristalle im Nährboden sichtbar.

b) Strich auf ein schräg erstarrtes Gelatineröhrchen am 5. 10. 1911 gemacht und am 23. 10. 1911 untersucht. Der Strich war 6 mm breit, grauweißlich, durchscheinend opaleszierend. Es war nur ganz schwaches Wachstum in den Nährböden vorhanden. Kristallausscheidung hatte stattgefunden, war aber nicht sehr deutlich sichtbar. Eine Verflüssigung der Gelatine wurde nicht festgestellt, diese zeigte nur schwache Erweichung und war etwas zusammengerutscht.

Nach weiteren 14 Tagen, am 6. 11. 1911, war etwa 1 ccm Gelatine verflüssigt.

7. Versuch. Nährboden: ⅓ D-Gelatine + 0,2 Proz. Ammonkarbonat. Ausführlich beschrieben p. 38.

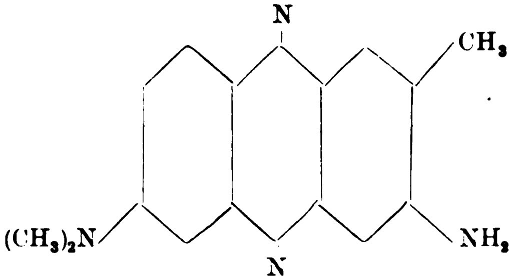
Es geht aus meinen Versuchen hervor, daß erst nach 2-jähriger Fortzüchtung der Bakterien auf künstlichen Nährböden eine schwache Gelatineverflüssigung beobachtet werden konnte, daß das Gelatineverflüssigungsvermögen dann bei weiter fortdauernder Kultur, nach 3 Jahren, noch stärker wurde. Bei Kulturen mit schräg erstarrter Gelatine war der Eintritt der Verflüssigung früher zu bemerken und diese bei meinen Beobachtungen etwa doppelt so stark, als in den Stichkulturen mit 8 cm hoher Gelatineschicht. In dem letzten Versuche (Versuch 7) benutzte ich Ammon-Gelatine (Nährstoffkonzentration = Ammon-Agar) und konnte in den Gelatinestichkulturen nach 5—6 Tagen einen kleinen Verflüssigungstrichter, nach zwei Wochen ungefähr einen Kubikzentimeter verflüssigte Gelatine feststellen. Nach insgesamt 8 Wochen waren 2—3 ccm Gelatine verflüssigt, während in den Strichkulturen mit schräg erstarrter Gelatine in der nämlichen Zeit gegen 4 ccm Gelatine verflüssigt waren.

Während Behrens (1896), Gottheil (1901) und andere Autoren (s. Fuhrmann, 1907) bei Formen, die anfangs Gelatine verflüssigten, nach längerer Fortzüchtung auf künstlichen Nährböden einen Verlust des Gelatineverflüssigungsvermögens beobachten konnten, liegt hier der umgekehrte Fall vor, daß nämlich diese Fähigkeit erst nach längerer Fortzüchtung auftrat. Dabei ist allerdings zu beachten, daß ich bemüht war, eine Stärkung des Wachstums auf künstlichen Nährböden zu erreichen.

Reduktion von Neutralrot (Reduktase).

Neutralrot ist nach den Farbstofftabellen von Schultz und Julius (1897. p. 176) ein wohl charakterisierter Farbstoff. Neutralrot, auch Toluylenrot genannt, ist eine Azinfarbe und hat folgende Zusammensetzung:

Dimethylamidotoluphazinchlorhydrat:



Eigenschaften:

In Wasser leicht löslich mit karmesinroter Farbe, in Alkohol leicht löslich mit fuchsinroter Farbe und schwach rotbrauner Fluoreszenz.

Mit Salzsäure färbt sich Neutralrot blau, im Überschuß reinblau.

Mit Schwefelsäure grün, auf Zusatz von Wasser dann zuerst blau, dann fuchsinrot.

Natronlauge bildet in Neutralrotlösungen einen gelbbraunen Niederschlag, die alkoholische und ätherische Lösung fluoresziert stark.

Bezugsquelle: Dr. G. Grübler u. Co., Leipzig.

Neutralrot wurde zuerst von Rothberger (1898) zur Differentialdiagnose empfohlen; während Typhusbakterien die Farbe von Neutralrot nicht verändern, kann man bei typhusähnlichen und anderen Bakterien eine deutliche Veränderung, zuweilen bis zur völligen Entfärbung des Farbstoffes gehend beobachten und benutzt deshalb Neutralrotagar zur Unterscheidung der Typhusbakterien von typhusähnlichen (siehe Abel, 1910. p. 72). Rochaix und Dufourt (1910) empfehlen, meines Erachtens dabei viel zu weitgehend, Neutralrot zur Unterscheidung von harnstoffspaltenden und nicht harnstoffspaltenden Bakterien; jene, wozu die Forscher nach Hallé und Dissart (1893) auch die Colibakterien rechnen, verändern den Farbstoff in auffälliger Weise.

Der von Abel (1910. p. 72) zur Differentialdiagnose empfohlene Neutralrotagar ist folgendermaßen zusammengesetzt:

100,0 g Nähragar mit 0,3—0,75 Proz. Agar
0,3—0,5 Proz. Dextrose
1,0 g einer kaltgesättigten, wäßrigen, im Dampf sterilisierten Neutralrotlösung.

Nach Rothenberger (1898) setzt man 1—2 Tropfen einer 2-proz. wäßrigen Neutralrotlösung zu einem Röhrchen Nähragar, der dadurch dunkelrot gefärbt wird.

Rothenberger arbeitete mit „Schüttelkulturen", d. h. er verteilte das Impfmaterial in dem noch flüssigen Agar durch Schütteln; Wolff und Scheffler empfehlen dagegen „Stichkulturen", sie bringen das Impfmaterial durch einen Stich in den erstarrten Agar; die Farbveränderung geht dann vom Stich aus und ist deutlicher zu sehen.

Ich wandte ebenfalls Stichkulturen an und zwar nahm ich Ammon-Agar, dem auf je 5 ccm nach den Angaben von Rothenberger in dem

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

einen Versuche ein und in dem 2. Versuche 2 Tropfen einer 2-proz. wäßrigen Neutralrotlösung zugesetzt worden waren.

Versuch 1: Ammon-Agar mit 1 Tropfen Neutrallösung zeigt bei durchscheinendem Licht eine orangerote Färbung ohne Fluoreszenz, bei auffallendem Licht eine nahezu burgunderrote Färbung mit deutlicher, schwach rötlicher Fluoreszenz.

In dem geimpften Agar trat schon nach 3 Tagen ein deutlicher Umschlag in gelb ein. Die nach 2 Wochen beobachtete Kultur zeigte folgendes Bild:

Makroskopisch. Durchscheinendes Licht:

Der Stich ist wolkig getrübt und zeigt rübenförmiges Wachstum; der Agar ist dunkelgelb gefärbt ohne Fluoreszenz.

Auffallendes Licht: Auf der Agaroberfläche ist ein zusammenhängender, etwas erhabener, gelblicher bis schwach rötlicher Belag, der Agar ist schmutzig- bis bräunlichgelb verfärbt.

Mikroskopisch. Die Kultur macht einen geschwächten Eindruck, die Stäbchen zeigen Neigung zur Fadenbildung, sind vorwiegend dünner und länger (Dicke 0,7, Länge 5 μ durchschnittlich) als im normalen Zustand. Sporen sind vorhanden, jedoch nicht sehr viele.

Versuch 2. Ammon-Agar mit 2 Tropfen Neutralrotlösung ist deutlicher rot gefärbt und zeigt auch nach der Impfung und längerem Wachsen der Bakterien einen rötlichen Schimmer. Die Kultur verhält sich makroskopisch und mikroskopisch genau wie die in Versuch 1 beschriebene; d. h. mikroskopisch war das Wachstum und das Sporenbildungsvermögen noch mehr geschwächt.

In den geimpften Kulturen trat eine Ausscheidung von blutroten Kristallnadeln ein, die ungeimpften Kulturen blieben völlig unverändert. Das Reduktionsvermögen des B. probatus ist somit erwiesen.

Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd unter Bildung von Sauerstoff (Katalase).

Die Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd durch Bakterienkulturen ist sehr häufig beobachtet worden (Lit. s. Oppenheimer, 1909. p. 398, oder vollständiger bei Kruse, 1910. p. 471). Ich verwendete zu meinen Versuchen 3-proz. und 30-proz. Wasserstoffsuperoxyd, auf dessen Zusatz ich in allen flüssigen Kulturen, in denen Wachstum eingetreten war, eine kräftige Schaumbildung unter Sauerstoffentwicklung beobachten konnte. Die ungeimpften Nährlösungen zersetzten Wasserstoffsuperoxyd nicht im geringsten.

Oxydase und Peroxydase.

Über das Vorkommen von Oxydasen bei Bakterien habe ich in der Literatur nichts finden können.

Zum Nachweis der Peroxydase versetzte ich 4 Wochen alte, ammoniumkarbonathaltige Bouillonkulturen mit 1-proz. wäßrigem Guajakol und wenigen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd (Kobert, 1903). Eine Färbung konnte nicht beobachtet werden; zum Vergleich wurde ein wäßriger Brei gekeimter Erbsen herangezogen, der auf Zusatz des Kobertschen Reagenzes sofort braunrot gefärbt wurde.

Die Versuche müßten mit jüngeren Bouillonkulturen wiederholt werden

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Diastase = Amylase.

Zum Nachweis einer Diastasebildung habe ich die Methoden von A. Meyer (s. Gottheil, 1901. p. 463) und die von Beijerinck (1899. p. 367; s. auch Vahle, 1909. p. 56) benutzt.

Weder die in Stärkebouillon noch die auf alkalischem ⅓ D-Agar gewachsenen Bakterien erzeugten Diastase.

Urease.

Musculus (1874. p. 132; 1876. p. 214) fand zuerst in schleimigem, ammoniakalischem Harn ein Enzym mit harnstoffspaltender Wirkung. Diese Beobachtung wurde dann später von Pasteur und Joubert (1876. p. 5), Lea (1886. p. 136; 1890. p. 226), Miquel (1890) und anderen Forschern bestätigt und ihre Entstehung auf die Fähigkeit von harnstoffspaltenden Bakterien zurückgeführt.

Auch bei Pilzen wurde Urease gefunden (s. Kikkoji, 1909. p. 80) oder doch ihr Vorkommen recht wahrscheinlich gemacht durch das Wachsen mehrerer Pilze in harnstoffhaltigen Flüssigkeiten, wobei Ammoniak abgespalten wurde (s. Miquel, 1878, 1879, 1882; Semal, 1898. p. 279; 1899. p. 205 und besonders Kossowicz, 1912 a. p. 60; 1912 b. p. 36). Takeuchi (1909) fand sogar in Samen und Keimlingen der Sojabohne (Soja hispida) reichliche Mengen eines harnstoffspaltenden Enzyms, eine Beobachtung, die ich nach Anstellung einiger Versuche bestätigen kann.

Musculus (l. c.), Lea (l. c.), Beijerinck (1901. p. 55) und Moll (1902. p. 344) gewannen das Enzym durch Fällen des ammoniakalischen Harnes mit Alkohol.

Miquel (1904. p. 82; 1898; 1890. p. 397) versetzte Peptonbouillon mit Ammonkarbonat oder meist mit 0,2—0,3 Proz. Harnstoff, impfte mit gärkräftigen Harnstoffbakterien und züchtete bei 30—35° unter Durchleitung eines schwachen Luftstromes zur Anregung der Zellvermehrung.

Wurden mehrere Liter dieser Bouillon einige Tage nach der Impfung durch Porzellanfilter — möglichst bei Abschluß der Luft — filtriert, so behielt das Filtrat nahezu die gleiche harnstoffspaltende Wirkung. Auch nach den Angaben von Pasteur und Joubert (1876) ist das Enzym filtrierbar.

Die Ansichten über die Weise, in welcher das Enzym tätig ist, gehen auseinander: Musculus und vor allem Miquel sind der Ansicht, daß das Enzym aus der lebenden Zelle in die Nährflüssigkeit heraustrete, also ein Ektoenzym sei. Leube (1885) bestreitet dies, er hält vielmehr die Harnstoffspaltung für eine spezifische Lebensäußerung der Harnstoffbakterien. Lea (1890) meint dagegen, daß die Urease als Endoenzym an die lebende Zelle gebunden sei, bei deren Abtöten, er benutzte dazu Alkohol, aber frei und löslich werde. Beijerinck (1901) und Moll (1902) halten die Urease ebenfalls für ein Endoenzym. Beijerinck (p. 57) kommt auf Grund seiner Versuche zu der Überzeugung: „Die Urease ist ein unlösliches Enzym, welches sowohl an dem lebenden, wie dem toten Bakterienkörper festgebunden ist.“ Er machte folgende Versuche mit Micrococcus ureae: Er filtrierte die ureasehaltige Kulturlösung durch Fließpapier, brachte das Filtrat wie den Filterrückstand getrennt mit Harnstofflösung in Berührung und beobachtete dann das weit größere Spaltungsvermögen des Filterrückstandes. Diese Versuche wurden bei 50°, einer für die Kokken tödlichen, für das Enzym nur wenig schädlichen Temperatur vor-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

genommen; in anderen Versuchen, die zu dem nämlichen Resultate führten, waren die Kokken mit Chloroform abgetötet worden. In seinen Diffusionsversuchen prüfte er mit lebenden und toten Bakterien durch Striche geimpfte Kulturplatten nach wochen- bis monatelangem Stehen mittels der Iriserscheinung auf etwa in den Nährboden diffundiertes Enzym, konnte aber niemals Farbenringe beobachten. Dieses Ausbleiben der Iriserscheinung ist jedoch, wie oben schon hervorgehoben wurde, nicht beweisend für die Abwesenheit der Harnstoffbakterien oder deren Enzym, weil sie nicht immer auftritt. Die anderen Versuche Beijerincks sprechen für seine Ansicht, ohne diese allerdings ganz sicherzustellen. Exakte Filtrationsversuche mit Bakterienfiltern hat Beijerinck selbst nicht gemacht, er stützt sich auf die Angaben Leubes (1885), der kein Enzym in der durch eine Kerze filtrierten Urokokkenkultur erhalten konnte.

Die abweichenden Resultate der Forscher Musculus und Miquel führt Beijerinck darauf zurück, daß in den vermeintlichen Enzymlösungen nicht bemerkte ureasebildende Keime vorhanden waren, die bei Miquel wahrscheinlich durch Verwendung fehlerhafter Filterkerzen in das Filtrat hatten gelangen können.

Beachtenswert scheint mir die von Kruse (1910. p. 597) ausgesprochene Meinung, daß sich die Widersprüche in den Resultaten vielleicht auch durch die Verschiedenheit der benutzten Bakterien erklären lassen. Leube wie Beijerinck verwendeten zu ihren Enzymgewinnungsversuchen „Urokokken“, Miquel nahm seine gärkräftigsten stäbchenförmigen „Urobazillen“. Im Hinblick auf die Gewinnung von Antiurease durch Moll sagt Kruse (p. 598): „Vielleicht könnte man mit Hilfe der Antiurease Unterschiede der einzelnen Ureasen nachweisen.“

Meines Erachtens müßte man die Frage, ob die Urease ein Ekto- oder ein Endoenzym ist, und ob dieses auch an den toten Zellkörper gebunden ist oder nicht, in folgender Weise entscheiden können: Größere Mengen ureasehaltiger Bouillon müßten möglichst bei Sauerstoffabschluß, am besten vielleicht in einer Kohlensäure- oder Ammoniakatmosphäre durch fehlerfreie Filterkerzen filtriert werden; ein Teil des steril aufgefangenen Filtrates wäre direkt mit Harnstofflösung zu versetzen, könnte auch mikroskopisch bei schwacher Vergrößerung in der Zählkammer auf Bakterien untersucht werden; ein anderer Teil des Filtrates wäre zu zentrifugieren und der Bodensatz mikroskopisch zu untersuchen; der dritte Teil wäre mit Alkohol zu versetzen, zu zentrifugieren und das Abgeschleuderte sowohl auf etwa vorhandene Bakterien wie mit Harnstofflösung auf Spaltungsvermögen zu untersuchen. Wenn sich hierbei ein Spaltungsvermögen des Filtrates bei völliger Abwesenheit von Bakterien herausstellte, so wäre damit das Vorhandensein eines Ektoenzyms sicher bewiesen. Würde man, wenn kein Enzym gefunden worden wäre, dann nach Beijerincks Vorgang die in der ursprünglichen Kulturflüssigkeit enthaltenen Bakterien durch Erwärmen auf 50° zum Absterben bringen und dann in der genannten Weise filtrieren und weiter untersuchen, so könnte man schließlich bestimmt entscheiden, ob das Enzym beim Abtöten der Zellen aus diesen heraustritt oder nicht.

Bezüglich des Temperatureinflusses auf Urease ist folgendes zu bemerken: Nach Miquel (1904. p. 82) liegt das Optimum der Ureasewirkung bei 48—50°, das Maximum in der Nähe von 80° (1 Minute bei 80° tötet), das Minimum unterhalb 0°; bei —5° ist nach mehren Tagen eine merkliche Schwächung vorhanden.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Gegen die gebräuchlichen Giftlösungen und Lösungsmittel wie Äther, Alkohol, auch Chloroform und Toluol, gegen Säuren und Alkalien ist das Enzym sehr empfindlich; Fluornatrium zerstört es weniger leicht (s. Miquel [1904] und Moll).

Gegen Sauerstoff ist die Urease nach Miquel (1904. p. 82) sehr empfindlich, kaum oder nicht empfindlich gegen andere Gase wie Leuchtgas. Nach Ladureau (1884. p. 877; s. auch Oppenheimer, 1909) bleibt das Enzym im luftleeren Raum, und wenn Stickstoff, Wasserstoff oder Kohlensäure zugegen sind, selbst bei 3 Atmosphären wirksam.

Bezüglich der Einwirkung von Rohrzucker und Glyzerin sagt Miquel (1904. p. 82): „Einige Stoffe, wie Saccharose und Glyzerin, vermögen die Wirkungskraft der Urease zu verdoppeln und zu verdreifachen, vielleicht dadurch, daß sie das Enzym vor dem zu starken Angriff jener Temperatur schützen, welche die Hydrolyse am meisten begünstigt.“ Ich vermute dagegen, daß diese Stoffe die Zellvermehrung begünstigen und damit auch die größere Harnstoffspaltung zeitigen.

Hierher gehören wohl auch die Beobachtungen von **Machida** (1907. p. 1; siehe auch Kossowicz, 1912. p. 38), daß Magnesiumsalze, besonders Magnesiumchlorid, die Harnstoffzersetzung befördern; er bestätigt damit die Untersuchungen von **Burchard** (1899), der seiner Kulturlösung — er benutzte unverdünnten Harn — Magnesiumphosphat und in einem anderen Falle Gips zusetzte und besonders nach Magnesiumphosphatzusatz eine größere Harnstoffspaltung beobachten konnte; **Burchard** erklärt sich die Wirkung seiner Zusätze so, daß sie möglicherweise gute Nährsalze, möglicherweise auch Reizmittel für die Harnstoffspaltung seien.

Um diese Fragen zu klären, müßten Harnstoffspaltungsversuche mit bestimmt und gleich zusammengesetzten Nährlösungen ohne und mit Zusatz der genannten Stoffe, wie Magnesiumsalze, unter gleichzeitiger Festlegung der Vermehrungsgröße (siehe Keimzählung) gemacht werden.

Kapitel 6.

Tierversuche: Pathogenität und Giftbildung.

Pathogenität.

Die Feststellung der Bakterienwirkung im Tierkörper ist in der Bakterienforschung ein wichtiges, ja in vielen Fällen bis jetzt unentbehrliches Hilfsmittel zur Erkennung der Bakterienart geworden.

Ausführung des Versuches: Als Versuchstier wurde ein gesundes, sechs Wochen altes nicht vorbehandeltes Meerschweinchen benutzt; in die Bauchhöhle dieses Tieres wurde 1 ccm einer nahezu neutralen Aufschwemmung des Bakterienrasens einer 24 Stunden alten Ammon-Agarkultur in destillierten sterilen Wasser eingespritzt.

Der Einfluß der Einspritzung auf die Körperwärme des Tieres ist aus der Tabelle zu ersehen; die Temperaturmessungen wurden vorgenommen mittels eines in den After des Tieres eingeführten Maximalthermometers mit kleinem Hg-Gefäß.

Resultat des Tierversuches: Außer einem geringen Ansteigen der Körpertemperatur (siehe die Tabelle VIII) und einem schwachen Haarausfall konnten keine Folgeerscheinungen beobachtet werden: Das Versuchstier war nach 8 Tagen wieder völlig munter.

Tabelle VIII.

	Zeit der Messung	Temperatur
Meerschweinchen vor der Impfung	8. 11. 10^{30}	36,6°
„ nach „ „	8. 11. 10^{50}	
„ „ „ „	8. 11. 11^{30}	36,75°
„ „ „ „	8. 11. 1^{00}	36,9°
„ „ „ „	8. 11. 6^{00}	37,3°
„ „ „ „	8. 11. $10^{\underline{45}}$	37,5°
„ „ „ „	9. 11. 12^{30}	36,5°
„ „ „ „	9. 11. $6^{\underline{20}}$	37,6°
„ „ „ „	9. 11. $8^{\underline{00}}$	38,1°
„ „ „ „	10. 11. 11^{15}	37,4°
„ „ „ „	10. 11. 1^{00}	37,2°
„ „ „ „	10. 11. 5^{45}	37,6°
„ „ „ „	10. 11. $7^{\underline{20}}$	37,9°
„ „ „ „	13. 11. $6^{\underline{45}}$	37,7°
„ „ „ „	14. 11. 12^{15}	36,4°
„ „ „ „	15. 11. 1^{00}	37,2°

Giftbildung.

Zum Nachweise der Giftbildung beobachtete ich die Änderung des Blutdruckes und der Atemkurve der Versuchstiere, einem Kaninchen und einer Katze, in deren Blutbahn ein Teil der flüssigen Bakterienkultur luftfrei eingespritzt worden war. Zur Aufzeichnung des Blutungsdruckes und der Atemkurve wurde ein Registrierapparat (Kymographion) benutzt.

Als Impfmaterial fand eine 3 Tage alte, aus kräftigen Schwärmoidien bestehende Bouillonkultur Verwendung, je 1 ccm davon wurde den Tieren in die geöffnete Jugularvene eingespritzt.

Die nach der Einspritzung beobachteten Kurven zeigten nur ganz unwesentliche Störungen; kleine Abweichungen waren vorhanden, wurden aber in Kontrollversuchen auch durch ungeimpfte Bouillon hervorgerufen.

Eine durch die Bakterien erzeugte Bildung von Giftstoffen konnte also nicht beobachtet werden.

Kapitel 7.

Allgemeines und Methodisches über Harnstoffspaltung.

Allgemeines.

Wie wir eingangs gesehen haben, wird der Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure gespalten; es ist bemerkenswert, daß hier ein Organismus dieselben Spaltungsprodukte aus Harnstoff erzeugt, die wir auch bei der Hydrolyse des Harnstoffs durch Einwirkung von Säuren und Alkalien — besonders in der Wärme — auftreten sehen:

$$CO(NH_2)_2 + 2\,H_2O = CO_3(NH_4)_2.$$

Wird auch, wie Czapek (1905) meint, relativ wenig Energie bei der Harnstoffgärung frei, so hat doch die Größe des sehr bedeutenden Umsatzes die geringe Ergiebigkeit des Vorganges auszugleichen; „. . . . es liegt ein ungemein wichtiges ökologisches Moment in der Bedeutung der Harnstoffspaltung als Energiequelle“.

Es ist jedoch recht unwahrscheinlich, daß der Harnstoff als Energiequelle dient: das Wachstum in harnstoffhaltigen ist nicht so gut als in ammo-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

niumkarbonathaltigen, aber harnstoffreien Nährböden (siehe auch Miquel, 1898).

Wollte man eine Bedeutung in der Harnstoffspaltung suchen, so könnte man den Vorteil darin sehen, daß sie, ähnlich wie die Alkoholbildung der Hefe, den Harnstoffbakterien den Daseinskampf erleichtert, da nichtharnstoffspaltende Bakterien durch das bei der Spaltung entstehende Ammoniak in der Entwicklung gehemmt, wenn nicht gar getötet werden.

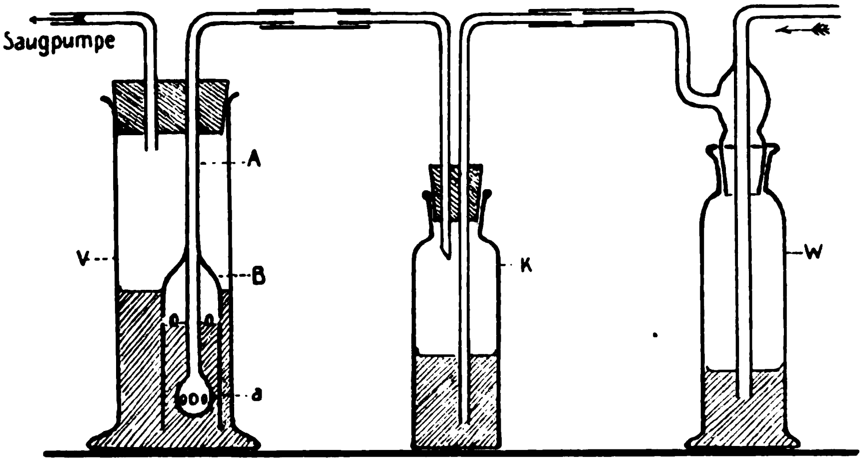
Bei Festlegung der Größe des Spaltungsvermögens bestimmte ich vorzugsweise die Mengen Ammoniak, die nach bestimmten Zeiten aus einer bekannten, der Kulturflüssigkeit zugesetzten Gewichtsmenge Harnstoff freigemacht wurden. Um nun bestimmt festzustellen, ob denn die Spaltung auch im Sinne obiger Gleichung verläuft oder ob bei der Spaltung aus Harnstoff noch Nebenprodukte gebildet werden, bestimmte ich in wenigen Fällen nach einer bekannten, nicht zu langen Versuchsdauer neben dem gebildeten Ammoniak auch noch den unzersetzten Harnstoff. (Die Resultate dieser Versuche sprechen für die Annahme einer glatten Spaltung; die Versuche sollen in peptonfreien Nährlösungen wiederholt werden.)

Ich benutzte deshalb eine Versuchsanordnung, die es mir erlaubte, in derselben Kulturflüssigkeit sowohl Ammoniak als auch Harnstoff zu bestimmen.

In der Literatur sind eine große Anzahl von Ammoniak- und Harnstoffbestimmungsmethoden angegeben; sie sind ausführlich und in kritischer Weise zusammengestellt in Neubauer-Hupperts „Analyse des Harns“, 1910, z. T. auch in Abderhaldens Handbuch 1911.

Zur Bestimmung des Ammoniaks habe ich die von Folin (1902, 1903, 1911) angegebene Methode benutzt und zur Bestimmung des Harnstoffes die von Gill, Allison und Grindley (1909—10) getroffene Abänderung des Benedikt-Gephartschen Verfahrens. Auf die Ausführung komme ich noch zurück.

Versuchsanordnung:



K.: Kulturgefäß.

Das Kulturgefäß war 12 cm hoch, hatte 5 cm Durchmesser und einen Inhalt von 200 ccm.

Als Verschluß der Gefäße nahm ich Korkstopfen aus bestem Kork, die luftdicht schlossen. Im Korkstopfen waren ebenfalls luftdicht eingepaßt zwei Glasrohre von 0,6 cm innerem Durchmesser; das eine Glasrohr war 30 cm, das andere 20 cm lang, bei beiden waren an dem einen Ende je 5 cm rechtwinklig abgebogen; das kürzere Rohr war an dem geraden Ende mit der Feile abgeschrägt; ich mußte Korkstopfen an Stelle von Gummistopfen nehmen, weil die Kulturgefäße im Heißluftschrank sterilisiert wurden.

W.: Waschflasche für die Luftreinigung (s. Ammoniakbest.).

V.: Vorlage.

Als Vorlage diente ein 20 cm hoher Zylinder aus alkalifreiem Jenaer Glas mit Fuß. Der innere Durchmesser betrug 4 cm, der Inhalt 180 ccm. Durch den Korkstopfen der Zylinderöffnung gingen, luftdicht eingeführt, 2 Glasrohre von 0,6 cm innerem Durchmesser und verschiedener Länge: das eine war 10 cm, das andere 23 cm lang, je 5 cm waren auch hier bei beiden an dem einen Ende rechtwinklig abgebogen. An dem geraden Ende des langen Glasrohres war ein Absorptionsrohr nach Folin angeschmolzen.

A.: Absorptionsrohr nach Folin.

Dieses Absorptionsrohr bestand aus einer Glasröhre, die bei a zu einer kleinen Kugel ausgeblasen war.

In der Kugel waren mit einem glühenden Platindraht 5—6 Öffnungen angebracht worden; sie befanden sich in gleicher Höhe und waren möglichst gleich groß, etwa 1 mm im Durchmesser. Wird die gleiche Lage und Größe beim Anbringen der Löcher nicht beachtet, so werden später während des Versuches beim Durchsaugen der Luft nur einige Löcher in Anspruch genommen und so die Gasblasen nicht gleichmäßig verteilt. Mit der Glasröhre A war ein Zylinder folgender Beschaffenheit verschmolzen worden.

B.: Zylinder zum Absorptionsrohr nach Folin.

Der Glaszylinder war 7,5 cm lang, hatte einen Durchmesser von 2,5 cm und war auch mit Löchern versehen, die hier etwa 2 mm im Durchmesser maßen und in gleicher Höhe, 3 cm vom angeschmolzenen Ende des Zylinders entfernt, angebracht waren.

Vorbereitung des Versuches.

Die oben beschriebenen Kulturgefäße wurden an der Wasserstrahlluftpumpe auf luftdichten Verschluß geprüft, die offenen Glasrohrenden mit Wattepfropfen verstopft und die Flaschen dann im Heißluftschrank bei 140° sterilisiert. Nach der Sterilisation wurden die noch heißen Gefäße mit 20 ccm heißer steriler Harnstoffbouillon, die in Rex-Konservenflaschen sterilisiert worden waren, beschickt; zur Abmessung diente ein steriler Meßzylinder oder ein geeichtes Reagensrohr mit Ausguß. Zur Abhaltung von Luftkeimen wurde das Eingießen der Kulturlösung und die Impfung unter einer Glasplatte vorgenommen. Die Impflösung ließ ich meist durch eine sterile Pipette einlaufen. Da beim Öffnen der Kulturflaschen wie beim Schließen durch die Hände immerhin eine Infektion möglich war, so wurden auch diese möglichst keimfrei gemacht. Nach der Impfung der Bouillon wurden die Glasrohrenden der Gefäße an Stelle der Wattepfropfen zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten mit kurzen Schlauchstücken versehen, die nach außen hin durch Klemmen und Glasstäbe verschlossen waren. Die Kulturflaschen kamen dann in den Brutraum oder Brutschrank, wo sie bei konstanter Temperatur eine bestimmte Zeit stehen blieben.

Ammoniak-Bestimmung.

Zur Bestimmung des in den Kulturen aus Harnstoff gebildeten Ammoniaks benutzte ich zuerst die Methode von Folin, bei der das Ammoniakgas durch einen Luftstrom in eine Säurevorlage übergeführt wurde; ich benutzte die Saugluft einer guten Wasserstrahlluftpumpe.

Zwecks Vornahme der Ammoniakbestimmung wurde die erste Kulturflasche mit der auf den Ammoniakgehalt zu untersuchenden Kultur an zwei Vorlagen angeschlossen: der kürzere Glasrohrschenkel der Kulturflasche kam in Verbindung mit der schon erwähnten oben beschriebenen Säurevorlage, der längere mit einer Luftreinigungsvorlage; diese bestand aus 2 Waschflaschen (p. 284 und W der Fig.), einer mit etwa 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure, und einer mit ebensoviel gesättigter Natriumkarbonatlösung gefüllten Waschflasche. Durch die Waschung mit Schwefelsäure kam nur ammoniakfreie Luft zur Verwendung; etwas mitgerissene Spuren von Säure wurden dann beim Durchleiten durch die Natriumkarbonatvorlage zurückgehalten.

Die gewählte Versuchsanordnung erlaubte es mir, eine große Reihe von Versuchen nebeneinander gleichzeitig vorzunehmen, indem ich eine Luftreinigungsvorlage benutzte, und dann hintereinander abwechselnd Kulturlösung und Säurevorlage einschaltete. Das kurze Rohr der Kulturflasche mußte dabei immer mit dem Absorptionsrohr der Säurevorlage verbunden sein. Die Luftdurchleitung durch mehrere Flaschen und Vorlagen machte gar keine Schwierigkeiten, wenn diese luftdicht schlossen.

Dadurch, daß bei meinen Versuchen die Anschlüsse mit den Schlauchstücken der Kulturflaschen gemacht werden konnten, ohne den Klemmenverschluß zu öffnen, waren Verdunstungsverluste ausgeschlossen.

Das nicht gebundene Ammoniak wurde zunächst ohne Zugabe von Alkali in die Säurevorlage übergeführt; als Indikator legte ich ein feuchtes rotes Lackmuspapier nach kurzer Zeit der Luftdurchleitung und nach dem Abklemmen der Kulturlösung in den Anschlußschenkel der Säurevorlage. War nach Ingangsetzung des Versuches kein Ammoniak mehr nachzuweisen, dann wurde der Stopfen der Kulturgefäße gelüftet und nach einem Zusatz von 10—20 ccm Methylalkohol (später Äthylalkohol), 10,0 g Natriumchlorid und 2—3 g kristallisiertem Natriumkarbonat sofort wieder geschlossen. In einigen Versuchen wurde die mit Alkohol gemischte Salzlösung mittels des Luftstromes durch den langen Ansatzschenkel in die Kulturflaschen hineingesogen; diese Methode wurde weniger häufig angewandt, weil durch Zugabe der Salzlösung, an Stelle des festen Salzes die Flüssigkeitsmenge in der Kulturflasche vermehrt und die zur völligen Austreibung des Ammoniaks erforderliche Dauer der Luftdurchleitung vergrößert wurde.

Zur Vermeidung des Schäumens der Kulturlösung beim Durchströmen der Luftblasen machte ich ihr Zusätze von flüssigem Paraffin, Toluol oder Alkohol; Alkohol bewährte sich weitaus am besten; da er allmählich verdunstete, gab ich von vornherein genügend davon zur Flüssigkeit, sog wohl auch öfters noch während des Versuches einige Kubikzentimeter in die Flaschen ein.

Zur Austreibung des Ammoniaks habe ich versuchsweise auch Barythydrat an Stelle von Natriumkarbonat der Flüssigkeit zugesetzt; in späteren Versuchen nahm ich jedoch davon Abstand, da Barythydrat in diesen kohlensäurereichen Flüssigkeiten unlösliche, am Boden haftende Krusten von Baryumkarbonat bildete. Gegen den Schluß der Luftdurchleitung wurden die Kulturgefäße in Glashäfen mit etwa 30° warmem Wasser gestellt, um die Kohlensäure auf diese Weise aus der Säurevorlage auszutreiben.

Die Austreibung des Ammoniaks war bei Zimmertemperatur gewöhnlich nach 6 Stunden beendet; die Dauer der völligen Austreibung ist abhängig von der Temperatur der Kulturflüssigkeit, von der Menge des auszutreibenden Ammoniaks und von der Stärke des angewendeten Luftstromes. Daß diese Verhältnisse zu berücksichtigen sind, daß ferner vor allem die Austreibung des Ammoniaks eine vollständige ist, geht aus den Resultaten der folgenden Versuche hervor:

1. Einfluß der Temperatur auf die Dauer der Austreibung.

In 5 ccm einer 3-proz. Harnstofflösung ($^1/_1$ normal), die mit Schwefelsäure oder Salzsäure im Autoklaven hydrolysiert worden war, wurde der Ammoniakgehalt nach der oben beschriebenen Methode bestimmt. Vorgelegt waren 20 oder 30 ccm n/Schwefelsäure.

Wurden die Kulturflaschen von Anfang an in Glashäfen mit warmem (höchstens 40°), nach der Abkühlung wieder erneuertem Wasser gestellt, so war in allen drei Versuchen die Austreibung des Ammoniaks schon nach 4 Stunden beendet; es wurden genau 5 ccm n/Schwefelsäure gebunden von den ursprünglich angewendeten 5 ccm n/Harnstofflösung; in anderen Versuchen wurden die Kulturflaschen nicht in warmes Wasser gestellt, sondern blieben bei 17—20° stehen; nach 3 Stunden der Luftdurchleitung waren 3 ccm, nach 4 Stunden 4,4 ccm und nach 7 Stunden 5 ccm gebunden; Anwendung von Wärme beschleunigt also die Austreibung des Ammoniakgases, diese ist eine völlige. Eine 40° übersteigende Temperatur ist aber zu vermeiden, da dann etwa in der Kulturlösung noch unzersetzt vorhandener Harnstoff vom Alkali angegriffen wird.

2. Einfluß der Ammoniakkonzentration auf die Dauer der Austreibung.

Es wurden 5 und 10 ccm einer 2/normalen (13,2-proz.) Ammonsulfatlösung nach der gleichen Folinschen Methode bestimmt, die Kulturflaschen standen bei etwa 17°. Vorgelegt waren 20 resp. 30 ccm n/H_2SO_4.

Während nun in den mit 5 ccm obiger Lösung nach zehnstündigem Durchleiten angesetzten Versuchen 9,8—10 ccm n/H_2SO_4 gebunden wurden, das Ammoniakgas also alles ausgetrieben war, hatten die mit 10 ccm unternommenen Versuche nach der gleichen Zeit statt 20 ccm nur 16,3 ccm verbraucht.

3. Einfluß der Stärke des Luftstromes auf die Dauer der Austreibung.

Übereinstimmend mit den Folinschen Angaben (l. c.) habe ich oft feststellen können, daß bei stärkerem Luftstrom das Ammoniak schneller in die Vorlage übergeführt wird. Folin hat hierüber quantitative Versuche gemacht.

Die Titration des in die Säurevorlage übergeführten Ammoniaks konnte meist schon in der Säurevorlage selbst vorgenommen werden.

Als Indikator fand Alizarin in alkoholischer Lösung (1 : 100 Alkohol absolutus) Verwendung; ein Zusatz von 2—3 Tropfen genügte meist, um den Umschlag scharf anzuzeigen; der Farbstoff ist in Säuren gelb, in Alkalien rot. Geringe Mengen Kohlensäure, die mit in die Vorlage übergeführt war, beeinträchtigten nicht den Farbenumschlag; dieser war bei Verwendung von Normallösungen selbst bei Lampenlicht gut zu sehen.

Zur Bestimmung des Ammoniaks benutzte ich ferner noch folgende Methode: Durch den kurzen Glasrohrschenkel der die vergorene, ammoniakalische Kulturflüssigkeit enthaltenden Kulturflaschen ließ ich titrierte Säure im Überschusse, aber in ganz bestimmter Menge zur Kulturlösung fließen; an dem innen abgeschrägten Ende des kurzen Glasrohres lief die Säure gut ab, zumal wenn das Ende mit dem längeren Glasrohr in Berührung stand und die Flüssigkeit an diesem herablaufen konnte. Das Umschütteln der Kulturlösung erfolgte erst, als die erforderliche Menge Säure zugegeben und das Gefäß durch den Klemmenverschluß wieder verschlossen war; schüttelt man zu früh, so wird durch die freigemachte Kohlensäure ein Überdruck im Innern erzeugt und die im Schenkel befindliche Säure steigt, zumal wenn das Glasrohr sehr eng ist, zurück, anstatt abzufließen; mit Hilfe eines kräftigen Luftstromes läßt sie sich natürlich immer wieder in die Kulturlösung treiben. Durch das Umschütteln wird alles Ammoniak von der Säure aufgenommen; die Kohlensäure ausgetrieben. Mittels einer Spritzflasche brachte ich in den wieder geöffneten kurzen Schenkel Wasser und spülte so die Säurespuren zur Kulturflüssigkeit, ebenso spülte ich den anderen, bis dahin noch verschlossenen Schenkel mit Wasser nach und öffnete schließlich das ganze Gefäß. Ich setzte im ganzen etwa 100 ccm Wasser hinzu, um die gelbe Farbe der Bouillon aufzuhellen; die Kohlensäure wurde durch kräftiges Schütteln der Flüssigkeit zum größten Teile entfernt; der zurückbleibende Teil beeinträchtigte nicht das Resultat, wie ich mich bei Kontrollversuchen, die zur Entfernung der Kohlensäure erwärmt wurden, überzeugen konnte.

Nach Zugabe von Alizarinlösung wurde dann, wie oben die im Überschusse vorgelegte Säure mit n/Kalilauge zurücktitriert.

Die Brauchbarkeit der Methode ergab sich dadurch, daß von völlig vergorener Harnstoffbouillon, die 2 Proz = 0,4 g enthielt, 13,3 ccm Säure = 0,393 g Harnstoff gebunden wurden.

Diese Methode der Ammoniakbestimmung wurde vor allem in den Versuchen benutzt, in denen neben der Größe der Harnstoffspaltung auch die Keimzahl bestimmt wurde. Wie bei Beschreibung der Zählmethode noch näher ausgeführt wird, wurde der Kulturlösung nach dem Säurezusatz und dem Umschütteln immer 1 ccm entnommen, der dann in geeigneter Weise weiter verdünnt, zur Feststellung der Keimzahl Verwendung fand.

Harnstoffbestimmung.

Zur Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Harn empfahlen Benedikt und Gephart (1909) nach der gesonderten Bestimmung des präformierten Ammoniaks die Hydrolyse der Flüssigkeit mit verdünnter Salzsäure im Autoklaven bei 6 Atmosphären; das gebildete Ammoniak trieben sie durch Destillation mit Lauge aus und titrierten es dann. Da bei der Destillation mit Lauge auch andere N-haltige Substanzen, wie Kreatinin und Harnsäure unter Ammoniakabspaltung zerlegt werden, so trieben Gill, Allison und Grindley (1909 oder 1910) das bei der Hydrolyse gebildete Ammoniak nach Folin (1902) in der Kälte durch einen Luftstrom aus. Ich verfuhr in der gleichen Weise und benutzte zur Hydrolyse im Autoklaven Röhren aus schwer schmelzbaren alkalifreiem Glas; sie waren ähnlich geformt, wie die in der Bakteriologie zum Teil noch gebräuchlichen anaëroben Röhren nach Buchner und faßten unterhalb der Einschnürung meist 25 ccm Flüssigkeit. Die Verengung hatte einen Durchmesser von 3—4 mm, damit die am inneren Rande in dünnen Strahlen ausströmende Flüssigkeit gut ablaufen konnte. Die Gläser wurden gewöhnlich mit höchstens 20 ccm gefüllt und nach dem Abschmelzen des oberen Ansatzstückes im Autoklaven bei 6 Atmosphären und ca. 160° 1½ Stunden erhitzt. Die Gläser konnten nach dem Öffnen ihrer Spitze und nach dem Anschmelzen eines Ansatzes immer wieder benutzt werden.

Ihr Inhalt wurde quantitativ in die bei Besprechung der Ammoniakbestimmung schon erwähnten Kulturgefäße übergeführt und die Bestimmung des gebildeten Ammoniaks in der dort beschriebenen Weise nach Folin ausgeführt.

Zur Kontrolle der völligen Hydrolyse im Autoklaven machte ich Versuche mit n/Harnstofflösung; die Versuche, die ich schon p. 286 angeführt habe, ergaben die völlige Spaltung des Harnstoffes in Ammoniak und Kohlensäure.

Daß auch kürzere Erhitzungsdauer und geringerer Druck im Autoklaven zur Hydrolyse ausreichen, zeigen folgende Versuche: 1. 5 ccm n/Harnstofflösung wurden mit 10 ccm n/Salzsäure 1½ Stunden bei 3 Atmosphären und 143° im Autoklaven erhitzt; nach dem Austreiben der Kohlensäure wurde die überschüssige Säure zurücktitriert, wozu genau 5 ccm n/Lauge erforderlich waren: die Hydrolyse war also eine vollständige.

2. 10 ccm n/Harnstofflösung wurden in einer 30 ccm-Röhre mit 15 ccm n/Schwefelsäure 1 Stunde bei 4 Atmosphären und 150° im Autoklaven erhitzt: Zur Neutralisation waren genau 5 ccm n/Lauge erforderlich, also auch hier aller Harnstoff gespalten.

Da in diesen Versuchen die Versuchsflüssigkeit völlig farblos war, so konnte die Titration des Ammoniaks direkt durch Zugabe von Lauge und Alizarin als Indikator vorgenommen werden; es geht sogar aus den Versuchen hervor, daß sich der Harnstoff in farblosen, neutralen Lösungen sehr einfach bestimmen läßt, indem man eine bestimmte Menge titrierter Schwefelsäure (besser geeignet als die Salmiaknebel bildende Salzsäure) zugibt, hydrolysiert und nach dem Entfernen der Kohlensäure den Überschuß an Säure zurücktitriert.

In den nach der Hydrolyse gelb-rotbraun gefärbten Peptonbouillon war eine direkte Titration des NH_3 nicht möglich.

Kapitel 8.

Allgemeines und Methodisches über Bakterienzählung.

Allgemeines.

Es gibt eine größere Anzahl von Methoden zur Bestimmung der Keimzahl; die Methoden fußen:

1. Auf der Bestimmung der Anzahl von Kolonien, die unter bestimmten Umständen auf Plattenkulturen entstehen.
2. Auf der Gewichtsbestimmung der durch Chemikalien ausgefällten Bakterien.
3. Auf mikroskopischer Auszählung eines gefärbten Bakterienausstriches.
4. Auf mikroskopischer Auszählung von Bakterien in einer Zählkammer.

Kurze kritische Besprechung der Zählmethoden:

Aus den zahlreichen Angaben in der Literatur über Bakterienzählungen, ich erwähne hier besonders Mac Neal, Latzer und Kerr (1909) und Breed, Robert (1911), da diese Forscher kritisch vergleichende

Versuche gemacht haben, geht hervor, welche Nachteile die oben genannten Methoden haben. Ich beschränke mich hier auf eine kurze kritische Zusammenstellung, ohne auf die sehr umfangreiche Literatur näher einzugehen.

1. Die ursprünglich von Buchner, Longard und Riedlin (1887) angegebene, später verbesserte Auszählung von Plattenkolonien gibt viel zu niedrige Werte.

Als Nachteile und Fehlerquellen sind zu berücksichtigen:

a) Die Kolonien gehen nicht immer, wie bei dieser Zählungsmethode vorausgesetzt wird, aus je einem einzelnen Keime, sondern sicher zum Teil auch aus Zellverbänden hervor.

b) Die Kulturverhältnisse, wie Nährtemperatur und Sauerstoffbedingungen, haben einen sehr großen Einfluß auf die Zahl der entstehenden Kolonien.

c) Die Zählung kann frühestens erst nach etwa 8 Tagen vorgenommen werden.

2. Die besonders von Rubner (1904) empfohlene Gewichtsbestimmung der durch Chemikalien ausgefällten Bakterien ist nicht brauchbar:

a) Alle Verunreinigungen, wie Nährbodenreste, ferner Schleim, Kristalle, Reservestoffe usw. werden mit gewogen.

b) Das Trocknen der Bakterienmasse hat zweifellos einen wägbaren Verlust flüchtiger Stoffe zur Folge.

c) Beim Abschleudern der Bakterien mit der Zentrifuge zwecks besserer Trennung und Entfernung des Nährbodens werden diese nicht quantitativ isoliert.

d) Die Gewichtsbestimmung ist umständlich und zeitraubend.

e) Wird nicht gleichzeitig die Anzahl der Bakterien festgestellt, so gibt die Methode der Gewichtsbestimmung nur relative Werte.

3. Die von Klein (1900, 1902 und 1906) angegebene und verschiedentlich verbesserte Methode beruht auf der mikroskopischen Auszählung eines gefärbten Ausstriches und hat folgende Nachteile:

a) Die Dosierung der Ausstrichflüssigkeit ist eine ungenaue.

b) Die Bakterien sind im Ausstrich nicht gleichmäßig verteilt, die Schicht ist verschieden dick.

c) Bakterienklumpen und kleinere Zellverbände werden durch die hier empfohlene Art der Färbung und des Ausstriches nicht zu Einzelzellen aufgelöst.

d) Verunreinigungen, die durch die Art der Färbung noch vermehrt werden, erschweren oft sehr die mikroskopische Zählung.

Da, wo als Verbesserung der Methode ein Zentrifugieren der ursprünglichen Bakterienmischung empfohlen wird, gilt das oben erwähnte.

4. Winterberg (1898) empfahl die mikroskopische Auszählung von Bakterien in einer Zählkammer.

Ich benutzte die Methode der Zählkammerzählung, da diese mir bei größter Einfachheit der Ausführung doch in kürzester Zeit die besten Resultate zu geben schien. Wie sich jedoch, übereinstimmend mit den diesbezüglichen Angaben in der Literatur herausstellte, hafteten der Methode Nachteile an, die erst beseitigt werden mußten: so waren

a) die Eigenbewegung sowohl, wie vor allem die Molekularbewegung der in der Zählkammer eingeschlossenen Bakterien sehr störend für die genaue Zählung;

b) ließ das häufigere Vorkommen von unzählbaren Bakterienhäufchen ein genaues Resultat nicht erwarten;

c) erschwerten Verunreinigungen nicht bakterieller Natur ungemein das Auszählen des mikroskopischen Bildes;

d) waren die Bakterien und zumal ihre Septen ohne Färbung nicht immer deutlich zu erkennen;

e) mußten die Bakterien, um Fehler zu vermeiden, die durch nachträgliche Vermehrung beim Stehen zu erwarten waren, sofort nach Beendigung des Versuches gezählt werden.

Um diese Übelstände zu beseitigen, machte ich nun folgende, von Erfolg gekrönte Versuche:

a) Aufhebung der Eigenbewegung, Molekularbewegung und Beschleunigung des Absetzens in der Zählkammer.

Während sich Gelatine, die in verschiedenen Konzentrationen zur Zählflüssigkeit zugesetzt wurde, nicht eignete, da sie zwar die Bewegung aufhob, aber das völlige Absetzen der Zellen verhinderte, erfüllte ein Zusatz von 1—5proz. Schwefelsäure sehr gut den gewünschten Zweck.

b) Auflösung der Klumpen und Zellverbände zu Einzelzellen.

Der Zusatz von verdünnter oder konzentrierter Schwefelsäure in der Kälte oder in der Wärme vermochte nicht die Klumpenbildung aufzuheben; vielfach wurden hierbei teilweise die Zellen zerstört. Kalilauge verschiedener Konzentration löste wohl die Bindesubstanz (sehr wahrscheinlich Schleim) der Zellverbände, aber nach längerer Berührung mit ihnen auch die Zellen selbst.

Frisch bereitetes Kupferoxydammoniak löste schon in wenigen Minuten völlig den Schleim (?) der Zellverbände, ohne die Zellen selbst nach mehrtägiger Berührung damit zu zerstören.

c) und e) Beseitigung der Verunreinigungen und Verhütung der Zellvermehrung.

Kupferoxydammoniak im Verein mit 1—5proz. Schwefelsäure lösten die störenden Verunreinigungen nichtbakterieller Natur und verhüteten die Vermehrung; sie zerstörten auch innerhalb weniger Tage nicht die Zellen, so daß nach ihrem Zusatz ein sofortiges Auszählen der Zählflüssigkeit nicht nötig war.

d) Sichtbarmachung der Bakterien durch Färbung zur Erleichterung der Zählung.

Durch Färbung mit Methylenblaulösung, die der mit Kupferoxydammoniak und verdünnter Schwefelsäure versetzten Zählflüssigkeit zugefügt wurde, ließen sich die Zellen und ihre Septen sehr deutlich hervorheben, gut zählen und von den Zellresten unterscheiden; besonders vorteilhaft erwies sich die Färbung bei der Sporenzählung zur Unterscheidung von gesunden, toten oder leeren Sporen — wie Sporangienmembranen.

Apparate zur Bakterienzählung.

1. Zählkammer nach Thoma-Zeiß (Abbildung in der Zeißschen Preisliste, in Kossowicz 1911; Abderhalden 1911, III, p. 2; besonders gut in Lafar, Bd. 5. p. 175).

Auf einem Objektträger ist ein 0,2 mm dicker Glasrahmen mit zentralem, kreisförmigem Ausschnitte aufgekittet, in der ein zweites, genau 0,1 mm dickes Glasplättchen befestigt ist; auf diesem Glasplättchen ist eine Netzmikrometerteilung eingeritzt, die die Mitte der 0,1 mm hohen Kammer einnimmt; es sind zwei zueinander senkrecht stehende Systeme von je 21 Linien eingeätzt, die in einem Abstande von 0,05 mm einander parallel laufen

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

und so 400 quadratische Felder von je 0,0025 qmm Flächeninhalt bilden $= {}^1/_{400}$ mm^2. Da die Kammerhöhe genau 0,1 mm beträgt, so ist der Rauminhalt über jedem Quadrat $= {}^1/_{4000}$ mm^3.

Man muß also die bei der Zählung im Mittel für ein Quadrat gefundene Zahl mit 4 Tausend multiplizieren, um die in einem Kubikmillimeter, mit 4 Millionen, um die in einem Kubikzentimeter enthaltene Anzahl von Keimen zu erhalten.

Die 0,2 mm hohe Zählkammer eignet sich weniger gut für die Zählung von Bakterien, da sich die Keime etwas schwerer absetzen, vor allem aber, weil sich bei der höheren Kammer die stärksten Trockensysteme nicht anwenden lassen und somit die Bakterien nicht deutlich genug erkannt werden können.

2. Deckglas.

Zum Bedecken der Zählkammer muß man planparallele Deckgläschen nehmen, da nur dann die in der Kammer eingeschlossene Flüssigkeit überall gleich hoch ist und nur unter diesen Bedingungen gleichmäßige Resultate zu erwarten sind. Die Dicke der Deckgläschen richtet sich nach der Stärke der zur Verwendung kommenden Linse: nimmt man z. B. die Linse D von Zeiß, so kann man noch 0,2 mm dicke Gläschen verwenden, beim Arbeiten mit Linse E kann man nur 0,15—0,17 mm dicke gebrauchen.

3. Maß und Vollpipetten.

a) Drei in ${}^1/_{40}$ Grade eingeteilte, geeichte 1 ccm-Pipetten (zur Blutzählung gebräuchlich).

b) 1—5 ccm, 10-, 15- und 20 ccm-Pipetten.

4. Schüttelpipette.

Die Schüttelpipette ist ganz ähnlich konstruiert, wie die von A. Meyer (1901. p. 126) angegebene Zählpipette; eine ziemlich enge Glasröhre zeigt an der Spitze eine birnförmige Erweiterung, in die ein kleiner Platinring eingeschmolzen ist, der beweglich ist und als Schüttelkörper dient; die Spitze ist möglichst stumpf und hat eine verhältnismäßig große Öffnung. Die Pipette wird mit einem Gummiball verschlossen. (Die Pipette ist zu beziehen von O. Kobe, Marburg a. L.)

5. Okular und Objektiv-Linsen.

Zur Einstellung des Systems auf das Mikrometernetz und zur Beurteilung der gleichmäßigen Verteilung des Keimmaterials auf dem Netz sind die Okulare 2 und 12 und das Objektiv B von Zeiß zu verwenden resp. zu empfehlen.

Zur Zählung der Sporen und Oidien sind von den Objektiven der Firma Zeiß D und E zu gebrauchen; nimmt man D, so kann man bei guter Beleuchtung noch mit den Okularen 12 und 18 beobachten; nimmt man das Trockensystem E, so kann man selbst bei recht kleinen Bakterien noch Okular 4 zur Zählung verwenden und braucht nur in zweifelhaften Fällen mit den Kompensationsokularen 8 und 12 genauer nachzusehen.

Beleuchtung.

Die Zählungen sind möglichst bei Tageslicht (weißem Wolkenlicht) vorzunehmen, da dann das Gesichtsfeld am hellsten und die Färbung am deutlichsten ist: mithin die Zählung am schnellsten und sichersten vor sich geht und die Augen am wenigsten angestrengt werden. Brauchbar war auch die A. Meyersche Mikroskopierlampe.

Reagentien zur Bakterienzählung.

1. Kupferoxydammoniak.

Das Kupferoxydammoniak ist frisch herzustellen; am einfachsten ist die Darstellung nach Mulder (1863) durch Auflösung von Kupferspänen in Ammoniak bei Gegenwart von Sauerstoff: Man füllt in eine lange mit Schlauch und Quetschhahn verschlossene Glasröhre Kupferspäne, übergießt sie völlig mit 30-proz. Ammoniak (0,91 spez. Gew.) und deckt die obere Rohröffnung mit einer Glaskappe. Die beim Öffnen des Hahnes ablaufende Flüssigkeit gießt man so lange zurück, bis reine Zellulose (entfettete Watte) gelöst wird. Das Reagens ist in gut schließenden Gefäßen aufzubewahren, seine Haltbarkeit ist gering.

2. 1- oder 5-proz. Schwefelsäure je nach der vorzunehmenden Verdünnung.

3. Methylenblaulösung 1 + 10.

Ein Raumteil einer gesättigten Lösung von Methylenblau in 95-proz. Alkohol wird mit 10 Teilen keimfreiem Wasser gemischt und filtriert.

Ausführung der Zählmethode.

Mischung der Zählflüssigkeit.

Man bringt mit der geeichten sterilen 1 ccm-Pipette 1 ccm aus der zu zählenden, gut umgeschüttelten und ganz gleichmäßig getrübten Flüssigkeit in ein trockenes, keimfreies Kölbchen, setzt Kupferoxydammoniak hinzu, läßt die Mischung unter öfterem Umschütteln kurze Zeit verschlossen stehen und versetzt dann mit verdünnter Schwefelsäure bis zur völligen Klärung. Sind nur wenig Bakterien in der zu zählenden Kulturflüssigkeit vorhanden, so nimmt man 5-proz. Schwefelsäure, von der man nur etwa 1 ccm zuzusetzen brauch; enthält die Kulturflüssigkeit sehr viel Keime, so setzt man mehrere Kubikzentimeter 1-proz. Schwefelsäure hinzu. Die Menge der zuzusetzenden Methylenblaulösung richtet sich nach dem Säurezusatz, nach der Art der Lichtquelle und nach der Farbenempfindlichkeit des untersuchenden Auges. Nimmt man 5-proz. Schwefelsäure, so wird man meist etwa die doppelte Menge Methylenblau nehmen können, nimmt man 1-proz. Schwefelsäure, so wird man etwa auf je 10 ccm Säure 2—3 ccm der Methylenblaulösung zusetzen können, um deutlich gefärbte Zellen und Septen zu erhalten.

Einfüllung der Zählflüssigkeit.

Aus der etwa 1 Minute umgeschüttelten Mischung nimmt man noch während des Schüttelns etwa $^1/_2$ ccm mit der Schüttelpipette heraus, entfernt die außen haftende Flüssigkeit mit Fließpapier, schüttelt den Inhalt in horizontaler Richtung mehrmals durch und bringt dann sofort einen kleinen Tropfen in die Mitte der Kammer, die so schnell wie möglich mit einem planparallel geschl. Deckglase bedeckt wird. Um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden (Bedingung!), setze man das Deckglas seitlich an und schiebe es in horizontaler Richtung über den Flüssigkeitstropfen. Ist der Tropfen zu klein, so sind Luftblasen nicht zu vermeiden; ist er zu groß, füllt er also nicht nur die eigentliche Kammer und die diese umgebende Rinne, sondern tritt er auch über den Glasrahmen hinaus, so wird das Deckglas, das normalerweise direkt auf dem Glasrahmen liegen soll, durch eine Flüssigkeitsschicht von diesem getrennt, dadurch aber auch die Höhe der Kammerflüssigkeitsschicht größer als 0,1 mm und das Zählresultat am Ende zu hoch; in beiden Fällen ist natürlich das Präparat zu erneuern.

Beobachtung und Zählung des Präparates.

Sieht man schon bei schwacher Vergrößerung, die so zu wählen ist, daß man etwa gerade das ganze Netz übersehen kann, eine unregelmäßige Verteilung der zu zählenden Zellen auf dem Mikrometernetz oder unzählbare Häufchen, so sind neue Präparate mit besser umgeschüttelter Zählflüssigkeit anzufertigen.

Die Zählung wird erst nach völligem Absetzen der Keime vorgenommen, was meist schon nach 15—30 Minuten geschehen kann. Nach den Berechnungen Abbees (1878) empfiehlt es sich, möglichst viel Quadrate der Zählkammer auszuzählen, da mit der Zahl der gezählten Zellen natürlich die Genauigkeit der Zählung wächst. Man wird also möglichst alle 400 Quadrate auszählen, aber auch, wie aus einem Teil meiner Kontrollversuche hervorgeht, bei Auszählung einer weit geringeren Anzahl von Quadraten immerhin noch brauchbare und vergleichbare Werte erwarten dürfen, natürlich unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Verteilung des Keimmaterials auf dem Mikrometernetz.

Sporenzählung.

Bei der Sporenzählung zählt man nur die lebenden Sporen; bei diesen ist durch den Zusatz der Methylenblaulösung nur die Membran deutlich blau gefärbt, während das Sporenplasma keine oder doch nur ganz schwache Blaufärbung, ferner eine noch deutliche Lichtbrechung zeigt; die toten Sporen dagegen sind völlig gefärbt, auch ihr Inhalt ist blau und nicht lichtbrechend.

Stäbchen- und Fadenzählung.

Hat man Fäden oder Stäbchen verschiedener Länge ohne oder mit unregelmäßiger Septenbildung zu zählen, so empfiehlt es sich nach meinen Erfahrungen bei nicht sporenbildenden Formen ihre durchschnittliche Länge, bei den sporenbildenden Bakterien die Länge des Normal-Sporangiums als Einheitsgröße der Zählung zugrunde zu legen; ein Faden also, der z. B. 3-lang, d. h. 3-mal so lang als das Normalsporangium ist, aber noch keine Septierung oder unregelmäßige Septierung zeigt, wird als 3 Stäbchen gerechnet. Um die Schwierigkeiten in der Beurteilung der Größen zu erleichtern, vergleicht man die Zellen öfters unter Zuhilfenahme eines Zeichenapparates mit einer Aufzeichnung der Einheitsgröße und berechnet alle Größen bis 1½ mit 1, von 1½—2½ mit 2 usw.

Anmerkung: Man könnte auch so verfahren, daß man die Stäbchen mäße und ihre Länge auf die Einheit des Längenmaßes bezöge. Mit Vorteil würde man dabei sicher ein Okularmikrometer benutzen können; dieses müßte auf den Normal-Objektivmikrometer geeicht, für Bakterienmessungen brauchbar sein und am zweckmäßigsten aus einem Netz von sehr kleinen, gleich großen Quadraten bestehen, die die Messung der Bakterien nach jeder Flächenrichtung hin erlaubten.

Stäbchen- und Fadenzählung in meinen Versuchen.

Ich habe die Stäbchen -und Fadenzählung in meinen Versuchen in verschiedener Weise vorgenommen.

1. In den ersten Versuchen wurde nur die mit Methylenblau sichtbar gemachte Septenbildung der Oidien bei ihrer Zählung berücksichtigt. Selbst lange Fäden, die keine Stäbigkeit oder Zelligkeit zeigten, wurden in Übereinstimmung mit der Zählungsart Winterbergs (1898) als ein Stäbchen gerechnet.

Das Resultat der Zählung beruhte also auf der Zählung von einstäbigen und fädigen Oidien.

Da der Eintritt der Septierung unregelmäßig und die Neigung zur Fadenbildung bei den verschiedenen Stämmen verschieden groß war, so mußten sich diese Unterschiede am Ende auch an den Zählresultaten geltend machen, die keinen Vergleich der verschiedenen Stämme zuließen.

2. Bei einigen weiteren Versuchen wurde der Zählung der Stäbchen die Septierung zugrunde gelegt; abweichend aber von der ersten Zählungsart wurden hier die unseptierten Fäden nach der durchschnittlichen Länge der im gleichen Präparate vorkommenden Stäbchen gemessen.

Das Resultat beruhte also auf der Zählung einstäbiger Oidien.

Diese Zählungsart eignete sich besser für den Vergleich, eine Einheitlichkeit des Zählresultates war aber auch hier wegen der ungleichen Länge der Stäbchen und ihrer Septen in den verschiedenen vergleichenden Versuchen nicht zu erwarten.

3. In den abschließenden Hauptversuchen wurde der Zählung die durchschnittliche Größe des Normalsporangiums zugrunde gelegt, in einigen Fällen auch gleichzeitig die Septierung berücksichtigt.

Das Resultat der Zählung beruhte also auf der Zählung ein-langer Oidien.

Diese Methode der Zählung ermöglichte, wie unsere Versuche zeigen, den Vergleich der Größe der Harnstoffspaltung eines Stammes bei verschiedenen Versuchsbedingungen, wie auch den Vergleich der Harnstoffspaltungsgröße bei den verschiedenen Stämmen und Spezies.

Vorbereitung meiner Zählversuche.

Bakterienmaterial.

Bei der Bestimmung der Spaltungs- und Vermehrungsgröße unter verschiedenen Versuchsbedingungen ging ich immer von einer bestimmten Morphode zur Impfung der Kulturlösungen aus. Wenn auch bei der Einimpfung von Sporenmaterial die Harnstoffspaltung gewöhnlich erst nach 15—20 Stunden nachweisbar ist, so habe ich doch den Sporen bei meinen Versuchen den Vorzug gegeben, da Oidien einer Schwächung leichter zugänglich sind, eine Einheitlichkeit zudem auch bei ihnen wegen ihres verschiedenen Alters kaum erreicht werden kann. Gerade bei Verwendung von Sporen, die durch Abkochen von lebenden Oidien befreit waren, als Ausgangsmaterial bei der Impfung war es mir möglich, immer wieder dasselbe oder doch in gleicher Weise vorgezüchtetes Material zu meinen Versuchen heranzuziehen.

Das Sporenmaterial stammte von Kulturen, die unter bestimmten Bedingungen, welche aus den jeweiligen Versuchen zu ersehen sind, gezüchtet waren.

Sporenzählung.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wurde in folgender Weise bestimmt:

Sporenmischung (Mischung 1): Eine Öse des von der ganzen Oberfläche der betreffenden Kultur entnommenen Bakterienmaterials wurde in den Abkochungsgläschen mit etwa 1 ccm sterilen Wassers bis zur gleichmäßigen Trübung verrührt, $\frac{1}{4}$ Minute im kochenden Wasserbade erhitzt und dieses Gemisch in etwa 10 ccm sterilen Wassers verteilt, das sich in kleinen sterilen Kölbchen mit langem engen Hals befand. Von dieser Mischung wurden immer 1 ccm mit der bis zu $^1/_{50}$ ccm eingeteilten sterilen 1 ccm-Pipette zur Zählung entnommen und in ein kleines, völlig trockenes, keimfreies Kölbchen ausgeleert. Der Rest der Sporenmischung wurde dann in genau abgemessenen Mengen zur Impfung der Kulturlösungen benutzt; die Impfung erfolgte bei den vergleichenden Versuchen erst nach Bestimmung der in 1 ccm der betreffenden Sporenmischung enthaltenen Sporenzahl.

Zählmischung (Mischung 2): Dem Zählungskubikzentimeter setzte ich in den ersten Versuchen genau abgemessene Mengen Schwefelsäure oder Kalilauge oder Kupferoxydammoniak, in den späteren Versuchen ein Gemisch von Kupferoxydammoniak, Schwefelsäure (1-proz. oder 5-proz.) und Methylenblau (1 + 10) hinzu, das je nach der erwarteten Sporenzahl eine etwas verschiedene Zusammensetzung hatte, z. B.:

(meist) 1 ccm der betreffenden Sporenmischung (1)
+ 1 ccm Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 2 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 5

oder

1 ccm der betr. Sporenmischung (Mischung 1)
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 1 ccm Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 3 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 6

oder

1 ccm der betr. Sporenmischung (Mischung 1)
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+10 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
+ 2 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 14.

Stäbchenzählung.

Die Zahl der in den Kulturlösungen nach Beendigung der Versuche vorhandenen Stäbchen wurde in folgender Weise bestimmt:

Stäbchenmischung (Mischung A): Der mit der Sporenmischung geimpften Kulturbouillon wurde nach bestimmten Versuchszeiten und überschüssigem Zusatz von bestimmten Mengen Normal-Schwefelsäure 1 ccm zur Zählung entnommen, der Rest zur Titration benutzt.

Stäbchenzählmischung (Mischung B): Der nach kräftigem Umschütteln mit steriler Pipette entnommene Zählungskubikzentimeter wurde in ein trockenes, steriles Kölbchen ausgeleert und ebenfalls wie die Sporenmischung mit Kupferoxydammoniak, Schwefelsäure und Methylenblau versetzt, je nach der erwarteten Menge Bakterien mit verschiedenen Mengen, z. B.:

1 ccm der Stäbchenmischung (Mischung A eines Versuchs)
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 2 ccm Schwefelsäure (5 Proz.)
+ 1 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 5

oder

1 ccm der Stäbchenmischung (Mischung A eines Versuchs)
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 1 ccm Methylenblau (1 + 10)
+ 4 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
Verdünnung 1 = 7

oder

+ 1 ccm einer Stäbchenmischung
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 5 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
+ 1 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 8

oder

1 ccm einer Stäbchenmischung
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+10 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
+ 3 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 15

oder 1 ccm einer Stäbchenmischung
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak
+ 20 ccm Schwefelsäure (1 Proz.)
+ 4 ccm Methylenblau (1 + 10)
Verdünnung 1 = 26

Sporenzählung.

Vorversuch, der die Brauchbarkeit der Thoma-Zeißschen Zählkammer beweisen sollte.

Versuchsmaterial: Bacillus probatus, ausgereiftes Sporenmaterial der 63., auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturdegeneration.

Mischung 1: Eine Öse des Bakterienmaterials wurde in den Abkochungsgläschen mit ½ ccm sterilen H_2O gut verrührt, ¼ Minute abgekocht und dieses Gemisch dann in 20 ccm sterilen H_2O verteilt.

Mischung 2: 1 ccm der Mischung 1 + 1 ccm Kupferoxydammoniak. Mit dieser möglichst gleichmäßigen Mischung wurde in der p. 84 angegebenen Weise die Zählkammer gefüllt, die Zählung nach dem völligen Absetzen der Sporen vorgenommen.

Versuch 2 zeigt weniger Sporenhäufchen und demgemäß auch eine bessere Verteilung der Sporen in den Feldern; die Sporenmischung war nämlich vor dem Einfüllen in die Zählkammer länger und kräftiger geschüttelt worden als in Versuch 1.

Die Übereinstimmung der Gesamtsporenzahl in den Zählungen 1 und 2 ist eine so gute, daß damit die Brauchbarkeit der Zählkammer für Bakterienzählungen ohne weiteres bewiesen ist.

Zählung 1:	auf 400 Quadrate		kamen	391 Sporen
„ 2:	„ 400	„	„	395 „
Resultat:	„ 800	„	„	786 „
	„ 1	„	„	0,9825 Sporen
	„ 1 ccm		„	0,9825 . 4 Millionen Sporen
	„ 1	„	„	3,92 Millionen Sporen
	„ 1	„ der Mischung 1	„	7,84 „ „

Tabelle IX.

Tabelle der Sporenzahl und Sporenverteilung in der Zählkammer.

Zählung 1.

4	1	0	0	1	0	0	3	3	0	0	1	1	3	0	1	0	0	0	1	19
0	1	0	1	2	2	4	0	0	1	0	0	0	0	1	2	3	0	2	2	21
2	0	2	0	0	2	2	1	0	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	15
0	0	0	0	2	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	10
1	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	2	1	3	1	1	16
2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	13
1	1	2	2	3	0	0	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	16
4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	3	0	0	0	3	0	17
0	2	0	5	5	0	1	0	0	1	1	4	1	0	0	1	1	0	4	3	29
0	0	0	1	1	3	0	1	0	0	2	1	0	3	1	2	3	1	1	2	22
4	1	0	1	0	3	2	0	2	6	1	2	0	0	0	0	0	3	1	0	26
2	0	0	0	5	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	4	2	0	0	18
1	0	0	1	0	2	0	2	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	3	15
0	1	1	0	1	2	5	3	1	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	1	20
0	1	1	0	1	0	1	2	0	1	1	0	0	1	3	1	2	0	3	1	19
0	0	7	2	0	1	3	0	0	1	2	0	1	5	4	1	3	9	1	0	40
2	0	1	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	4	2	0	0	2	0	19
2	0	0	5	0	1	4	1	2	3	0	1	4	0	2	0	0	2	0	1	28
0	0	1	1	0	0	2	1	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	13
2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	6	0	1	1	0	1	0	0	0	15
27	9	17	19	27	19	25	18	22	16	20	20	12	21	22	14	21	25	21	16	= 391

Zählung 2.

3	3	1	3	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	18
0	1	0	1	0	2	0	2	0	2	1	1	0	3	0	1	0	0	0	2	16
0	2	1	0	0	2	0	1	0	0	1	2	2	1	1	0	2	1	2	3	21
0	0	2	1	4	0	0	0	1	2	2	2	1	0	1	1	2	1	1	1	22
2	0	0	1	1	0	2	3	1	1	0	1	1	2	1	1	0	0	0	1	18
1	2	0	1	2	2	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	2	18
1	3	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	0	0	3	18
1	4	0	2	1	1	1	3	0	0	2	2	1	0	1	1	0	0	0	1	21
1	1	1	1	1	1	0	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	24
2	0	2	0	2	2	2	0	0	1	2	3	1	2	1	1	0	4	1	2	28
1	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	2	1	2	1	1	1	4	1	2	22
1	1	0	0	0	0	3	0	2	2	0	0	3	2	0	1	1	2	0	0	18
1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	3	1	1	3	0	1	1	2	19
1	2	1	2	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	16
2	1	0	3	1	3	0	1	0	3	1	0	0	0	1	1	2	0	1	0	20
1	0	0	2	2	4	1	0	2	0	0	0	2	0	4	0	0	2	1	1	22
1	0	3	3	1	2	3	0	2	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	20
0	0	1	0	3	3	2	2	0	2	1	1	0	0	2	2	2	1	1	1	24
2	1	0	2	0	0	0	0	1	1	0	2	0	3	0	1	1	1	0	1	16
1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	2	0	1	2	0	0	13
22	21	15	25	25	26	22	19	13	17	14	19	21	21	20	19	19	20	12	24	= 395

Kapitel 9.

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Quantitative Versuche ohne Ermittlung der Vermehrungsgröße.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Zusammensetzung der Nährlösung.

Vorversuche.

Kulturgefäß: 150 ccm fassende Erlenmeyer-Kölbchen aus Jenenser Glas mit flachem Boden, verbunden mit einer kugelähnlichen, mit n/Schwefelsaure gefüllten Säurevorlage.

Kulturflüssigkeit: M-Nährlösung (p. 251) + 0,5 Proz. Liebigs Fleischextrakt + 2 Proz. Harnstoff.

1. Menge: 20 ccm. Versuchstemperatur 28°.

Impfmaterial: 7 Tage altes, auf Harnstoff-Mineralagar gewachsenes Oidienmaterial.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 0,05 ccm n/H_2SO_4
b) „ 8- „ „ „ „ „ „ „ 10 ccm n/H_2SO_4
c) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 9 ccm n/H_2SO_4

2. Menge: 50 ccm Kulturflüssigkeit.

Impfmaterial: 3 Tage altes, auf Harnstoff-Mineralagar gewachsenes Oidienmaterial.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 0,1 ccm n/H_2SO_4
b) „ 1- „ „ „ „ „ „ „ 0,1 ccm n/H_2SO_4
c) „ 3 Woch. lang. „ „ „ „ „ „ 28,2 ccm n/H_2SO_4

Das gebildete Ammoniak wurde direkt durch überschüssige Zugabe von Säure und Rücktitration mit n/Lauge bestimmt. 1 ccm n/H_2SO_4 = 0,03 g Harnstoff.

Die Vorversuche lassen erkennen, daß in dieser peptonfreien Nährlösung die Harnstoffspaltung langsam vor sich geht: statt 13 ccm wurden nach 8 und 9 Tagen nur 9 und 10 ccm n/H_2SO_4 = 70—75 Proz., statt 33 ccm nach 3 Wochen nur 28 ccm Säure = 84 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gebunden.

Hauptversuche:

Kulturgefäß: Siehe die Abbildung und Beschreibung p. 75.

I. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Oidienmaterial einer 8 Tage alten, völlig vergorenen Harnstoffbouillon; diese enthielt ursprünglich 2 Proz. Harnstoff und war mit Sporen der vierten Kulturgeneration geimpft worden.

Impfmenge: 0,5 ccm der gut umgeschüttelten Bouillon.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 11,7 ccm n/H_2SO_4
b) „ 1- „ „ „ „ „ „ „ 11,8 ccm n/H_2SO_4

II. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Das gleiche wie in der ersten Versuchsreihe.

Impfmenge: Die gleiche wie in der ersten Versuchsreihe.

a) Nach 1-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 9,2 ccm n/H_2SO_4
b) „ 1- „ „ „ „ „ „ „ 9,8 ccm n/H_2SO_4

Die Hauptversuche ergaben, daß in peptonhaltigen Nährlösungen eine viel schnellere Harnstoffspaltung als in peptonfreien eintritt; wie äußerlich deutlich sichtbar, ist das Wachstum bei Peptonzusatz viel stärker. Die Versuche, die bei gleicher Versuchsdauer, mit gleichem Impfmaterial, mit gleicher Impfmenge ausgeführt wurden, zeigen, daß bei Zusatz von 5 Proz. Harnstoff eine geringere Harnstoffspaltung eintritt als bei Zusatz von 2 Proz. Harnstoff, da das Wachstum durch höheren Harnstoffgehalt geschwächt wird.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Menge des Impfmaterials.

Qualitative Versuche: Sporen- und Stäbchenzahl wurde nicht festgestellt.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

I. Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 41. Kulturgeneration (Ammon-Agar), ¼ Minute im kochenden Wasser erhitzt, nach der gleichmäßigen Verteilung in sterilem Wasser.

1. Impfmenge: 0,1 ccm der gut umgeschüttelten, gleichmäßig verteilten Sporenmischung entnommen mit der 1 ccm-Normal-Pipette.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 22,6 ccm n/H_2SO_4
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 22,65 ccm n/H_2SO_4

2. Impfmenge: 0,5 ccm obiger Sporenmischung.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 24 ccm n/H_2SO_4
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 24 ccm n/H_2SO_4

II. Impfmaterial: Oidienmaterial einer 8 Tage alten, völlig vergorenen Harnstoffbouillonkultur; diese enthielt ursprünglich 2 Proz. Harnstoff und war mit Sporen der 41. Kulturgeneration geimpft worden.

1. Impfmenge: 0,1 ccm dieser gut umgeschüttelten Bouillon, mit steriler Normalpipette entnommen.

a) Nach 2 Tagen wurden bei der Titration gebunden 3,5 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2 „ „ „ „ „ „ 3,5 ccm n/H_2SO_4.

2. Impfmenge: 0,5 ccm der gut umgeschüttelten Bouillon.

a) Nach 2-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 9,2 ccm n/H_2SO_4.
b) „ 2- „ „ „ „ „ „ „ 9,8 ccm n/H_2SO_4.

3. Impfmenge: 1 ccm der umgeschüttelten Bouillon.

a) Nach 2-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 15,8 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2- „ „ „ „ „ „ „ 13,6 ccm n/H_2SO_4.

Resultat: Die Resultate dieser Versuche lassen erkennen, welch großen Einfluß die Menge des Impfmaterials auf die Größe der Harnstoffspaltung hat, zumal dann, wenn die Versuchsdauer eine verhältnismäßig kurze ist. So ist z. B. der Unterschied in der Spaltungsgröße bei 2-tägiger Versuchsdauer viel größer als bei 6-tägiger.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Versuchsdauer.

I. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 10 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Ausgereifte Sporen der 41. Kulturgeneration (Ammon-Agar), in sterilem Wasser verteilt und ¼ Minute im kochenden Wasserbade erhitzt.

Impfmenge: 0,1 ccm dieser umgeschüttelten, gleichmäßig getrübten Mischung mit der Normalpipette entnommen.

a) Nach 4½-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 17 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 21 ccm n/H_2SO_4,
c) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 21,2 ccm n/H_2SO_4.

II. Versuchsreihe.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Oidienmaterial einer 8 Tage alten, völlig vergorenen Harnstoffbouillonkultur; diese enthielt ursprünglich 2 Proz. Harnstoff und war mit Sporen der 41. Kulturgeneration (Ammon-Agar) geimpft worden.

Impfmenge: 1 ccm der gut umgeschüttelten Bouillon, mit Pipette entnommen.

a) Nach 2-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 13,6 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 2- „ „ „ „ „ „ „ 15,8 ccm „
c) „ 4- „ „ „ „ „ „ „ 24,1 ccm „

Aus den Resultaten dieser Versuche geht der Einfluß der Versuchsdauer auf die Größe der Harnstoffspaltung schon deutlich genug hervor; später ausgeführte Versuche mit gleichzeitiger Bestimmung der Stäbchenzahl (siehe die Kurven p. 336—337) zeigen diesen Einfluß noch deutlicher.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Versuchstemperatur.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 5 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: 6 Wochen altes Sporenmaterial der 41. Kulturgeneration in sterilem Wasser gleichmäßig verteilt und ¼ Minute im kochenden Wasserbade erhitzt.

Impfmenge: 0,1 ccm der gut umgeschüttelten, gleichmäßig getrübten Sporenmischung.

I. Versuchsreihe. Versuchstemperatur = 28° C.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 22,6 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 22,65 ccm „

II. Versuchsreihe. Versuchstemperatur = 42° C.

a) Nach 6-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 9,7 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 6- „ „ „ „ „ „ „ 14 ccm „

Aus den Versuchen geht hervor, daß bei 42° bedeutend weniger Harnstoff gespalten wird als bei 28°; eine Erklärung für die etwas voneinander abweichenden Resultate der II. Versuchsreihe kann ich nicht geben. Die bei 42° gezüchteten Bouillonkulturen zeigten schon bei makroskopischer Betrachtung eine schwächere Trübung, ein schwächeres Wachstum bei dieser Temperatur war auch nach den bei Bestimmung der Kardinalpunkte gemachten Erfahrungen zu erwarten gewesen.

Versuche mit und ohne Luftzufuhr.

Kulturflüssigkeit: Bouillon + 1 Proz. Pepton + 10 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: 6 Wochen altes Sporenmaterial der 41. Kulturgeneration in sterilem Wasser gleichmäßig verteilt und ¼ Minute in kochendem Wasserbade erhitzt.

Impfmenge: 0,1 ccm der gut umgeschüttelten, gleichmäßig verteilten Sporenmischung.

Versuchstemperatur = 28° C.

I. Versuchsreihe. Die Kulturgefäße waren mit Watte verschlossen.

a) Nach 9-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 3,7 ccm n/H_2SO_4,
b) „ 9- „ „ „ „ „ „ „ 4,7 ccm „
c) „ 12- „ „ „ „ „ „ „ 8,3 ccm „

II. Versuch. Das Kulturgefäß war mit dem Glasrohraufsatz (s. Abb. p. 75) verschlossen, die äußeren Rohrenden (Durchmesser = 0,6 cm) waren mit Watte verschlossen.

Nach 5-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 25 ccm n/Säure.

III. Versuch. Das Kulturgefäß war mit der Säurevorlage luftdicht verbunden.

Nach 9-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 17,5 ccm n/Säure.

IV. Versuch. Das Kulturgefäß war luftdicht verschlossen, ohne Verbindung mit der Vorlage.

Nach 5-tägiger Kultur wurden bei der Titration gebunden 17 ccm n/Säure.

Aus den Versuchen der I. Versuchsreihe geht hervor, daß bei Verschluß der Kulturgefäße mit Watte sehr viel Ammoniak aus den Gefäßen entweicht, eine günstige Beeinflussung infolge des nahezu uneingeschränkten Luftzutrittes durch eine Bestimmung des vorhandenen Ammoniaks nicht ermittelt werden konnte; eine Bestimmung des etwa noch unzersetzt in der Flüssigkeit enthaltenen Harnstoffs hätte darüber Aufschluß geben können, wurde aber nicht vorgenommen.

Bei Versuch II war der Luftzutritt nur durch die engen, mit Wattepfropfen verschlossenen Glasrohrenden möglich, die Spaltungsgröße eine recht hohe; sie überstieg die der folgenden Versuche, bei denen der Luftzutritt völlig abgeschlossen war. Der Anschluß an die Säurevorlage hatte keinen fördernden Einfluß auf das Spaltungsvermögen, das selbst nach längerem Stehen nicht mehr Säure gebunden wurde.

Der Zutritt der Luft zur Kulturflüssigkeit scheint also, wie aus Versuch II zu erkennen ist, einen günstigen Einfluß auszuüben. Der exakte Beweis wäre so auszuführen, daß man von einer ganz bestimmten, zahlenmäßig festgestellten Sporenmenge ausginge, mit Hilfe des Aspirators eine bestimmte Zeit keim- und ammoniakfreie Luft durch die Kulturflüssigkeit leitete und am Ende die Vermehrungs- und Spaltungsgröße bestimmte; die Resultate müßten dann noch mit denen verglichen werden, die man erhielte in Kontrollkulturen, welche ohne Luftzutritt, aber unter sonst ganz gleichen Bedingungen gezüchtet worden wären.

Quantitative Versuche mit Ermittlung der Vermehrungsgröße.

Einfluß der Züchtung auf Harnstoff-freiem und 2 Proz. Harnstoff-haltigem Nährboden.

Zu diesen Versuchen wurden gleiche Sporenmengen der 19. Kulturgeneration benutzt, die aus einer Spore hervorgegangen waren und in dem einen Falle auf ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Ammonkarbonat und in dem anderen Falle auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff gezüchtet worden waren; die Sporen, die in beiden Fällen einen durchaus gesunden Eindruck machten, wurden in Harnstoffbouillon geimpft und nach gleichen Zeiten sowohl die Spaltungsgröße, als auch die Keimzahl bestimmt.

Der Zählung der Stäbchen wurden in dieser Versuchsreihe die durchschnittliche Länge einzelliger Oidien zugrunde gelegt; die unseptierten Fäden wurden nach der durchschnittlichen Länge der im gleichen Präparate vorkommenden Stäbchen gemessen.

1. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 19., auf ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Ammonkarbonat (Ammon-Agar) erwachsenen Kulturgeneration.

Sporenzählung.

Zählmischung + Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:
1. Auf 80 Quadrate kamen 26 Sporen,
2. „ 80 „ „ 26 „
Resultat: „ 160 „ „ 52 „
„ 1 „ „ 0,325 Sporen,
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,325 . 4 Millionen = 1,3 Millionen,
„ 1 ccm „ „ 1 „ 6,5 Millionen Sporen.

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchsdauer: 47 Stunden; Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 6,5 Millionen Sporen.

a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
+ 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm. der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt: 15 ccm n/H_2SO_4.
Zur Neutralisation waren nötig: 4,4 ccm n/KOH.
20 ccm ster. 2proz. Harnstoffbouillon erfordern: 0,2 ccm n/H_2SO_4.
Nach 47 Stunden waren also gebunden 10,4 ccm n/H_2SO_4 = 0,312 g H.
= 1,56 Proz. H.
= 78 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung: 1 = 15.
Zählung 1: Auf 60 Quadrate kamen 99 Stäbchen.
„ 2: „ 40 „ „ 67 „
Resultat: „ 100 „ „ 166 „
„ 1 „ „ 1,66 Stäbchen,
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,66 . 4 Millionen,
„ 1 ccm „ „ B „ 6,64 Millionen Stäbe,
„ 1 ccm „ „ A „ 90,6 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 3586 Millionen Stäbe.

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:
Nach 47 Stunden waren gebildet aus 6,5 Millionen Sporen: 3586 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon: 1,56 Proz. = 78 Proz. der zugesetzten Menge.

2. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 19., aus einer einzelnen Spore gezüchteten und auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff kultivierten Kulturgeneration.

Sporenzählung:

Zählmischung (Mischung 2) 1 ccm Sporenmischung (Mischung 1) + Zählzusatz. Verdünnung 1 : 5.

Zählung der Mischung 2.
„ 1: Auf 100 Quadrate kamen 57 Sporen,
„ 2: „ 20 „ „ 9 „
Resultat: „ 120 „ „ 66 „
„ 1 „ „ 0,33 Sporen,
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,33 . 4 Millionen.
„ 1 ccm „ „ 2 „ 1,32 Millionen Sporen,
„ 1 ccm „ „ 1 „ 6,6 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchsdauer 47¼ Stunden; Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung = 6,6 Millionen Sporen.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit, wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt: 15 ccm n/H_2SO_4.
Zur Neutralisation waren nötig: 3,6 ccm n/KOH.
20 ccm ster. 2proz. Harnstoffbouillon erfordern: 0,2 ccm n/H_2SO_4.
Nach 47¼ Stunden waren also gebunden: 11,2 ccm n/H_2SO_4 = 0,336 g Harnstoff
= 1,68 % „
= 84 % der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung

Mischung B: Verdünnung 1 : 15, wie in Versuch 1 b.
Zählung 1: Auf 60 Quadrate kamen 122 Stäbchen,
„ 2: „ 40 „ „ 74 „
Resultat: „ 100 „ „ 196 „
„ 1 „ „ 1,96 „
„ 1 ccm der Mischung B: 1,96 . 4 Millionen,
„ 1 ccm „ „ A: 1,96 . 4 . 15 = 117,6 Millionen,
„ 36 ccm „ „ A: 4234 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b.

Nach 47¼ Stunden waren gebildet aus 6,6 Millionen Sporen: 4234 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon: 1,68 Proz. = 84 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat: In den Versuchen 1 a und 1 b waren bei fast gleicher Impfmenge und Versuchszeit unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nur 3586 Millionen einzelliger Oidien gebildet und 1,56 Proz. = 78 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gespalten. Es scheint aus den ganzen Versuchen hervorzugehen, daß die auf harnstoffhaltigen Nährböden gezüchteten Sporen besser angepaßt sind an Harnstoff, deshalb sich schneller vermehren als die auf harnstoffreiem Nährboden gezüchteten, und ihre Kulturen deshalb auch in der Zeiteinheit ein stärkeres Wachstum aufweisen.

Es scheint auch, daß die größere Harnstoffspaltung eben durch diese stärkere Zellvermehrung zu erklären ist und daß das Vermögen der Harnstoffspaltung durch die Züchtung auf harnstoffhaltigem oder harnstoffreiem Nährboden nicht beeinflußt wird.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von verschieden langer Fortzüchtung auf harnstoffreien Nährböden.

Zur Ausführung dieses Versuches wurden Sporen der 21. und 101. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration in Harnstoffbouillon geimpft und nach gleichen Zeiten sowohl die Spaltungsgröße als auch die Keimzahl bestimmt.

1. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. Kulturgeneration von Bac. probatus.

Sporenzählung.

Zählmischung = Mischung 2. 1 ccm der Sporenmischung (1) dieser Versuchsreihe + Zählzusatz. Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:
„ 1: Auf 100 Quadrate kamen 137 Sporen,
„ 2: „ 60 „ „ 82 „
Resultat: „ 160 „ „ 219 „
„ 1 „ „ 1,37 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 1,36 . 4 Millionen Sporen,
„ 1 ccm „ „ 2 „ 5,44 „ „
„ 1 ccm „ „ 1 „ 27,2 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
Versuch a) Harnstoffspaltung.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 27,2 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 47 Stunden.

Die Mischung A bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit

36 ccm Flüssigkeit wird nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.
Im Überschuß waren vorgelegt: 15 ccm n/H_2SO_4.
Zur Neutralisation waren nötig: 2,7 ccm n/KOH.
20 ccm ster. 2proz. Harnstoffbouillon erfordern: 0,2 ccm n/H_2SO_4.

Nach 47 Stunden waren also gebunden: 12,1 ccm n/H_2SO_4 = 0,363 g Harnstoff
= 1,815 % „
= 90,75 % der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches (1 a),
Verdünnung 1 : 10.
Zählung 1: Auf 100 Quadrate kamen 164 Stäbchen,
„ 2: „ 80 „ „ 135 „
Resultat: „ 180 „ „ 299 „
„ 1 „ „ 1,66 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,66 . 4 Millionen Stäbchen,
„ 1 ccm „ „ B „ 6,64 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 132,8 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 4780 „ „

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 47 Stunden waren gebildet aus 27,2 Millionen Sporen: 4780 Millionen Stäbchen, und in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,815 Proz. = über 90 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff gespalten.

2. Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 101. Kulturgeneration von Bac. probatus.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) dieser Versuchsreihe.
Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:
„ 1. Auf 60 Quadrate kamen 82 Sporen
„ 2. „ 60 „ „ 77 „
Resultat: „ 120 „ „ 159 „
„ „ 1 „ „ 1,325 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 1,325 . 4 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 2 „ 5,3 „ „
„ 1 ccm „ „ 1 „ 26,5 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff. Versuchstemperatur 28° C.

Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 26,5 Millionen Sporen.

Versuchsdauer: 47¼ Stunden.

Vorgelegt wurden 15 ccm n/Schwefelsäure.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurden nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt. . . . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . . . 2,2 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . . 12,8 ccm n/H_2SO_4
20 ccm ster. 2-proz. H.-Bouillon erfordern 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 47¼ Stunden waren also gebunden 12,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,378 g Harnstoff
= 1,89% „
= 94,5% der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 2b. Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 2a + Zählzusatz.
Verdünnung 1 = 20.

Zählung der Mischung 2.
„ 1: Auf 160 Quadrate kamen 253 Stäbchen
„ 2: „ 40 „ „ 83 „
Resultat: „ 200 „ „ 336 „
„ 1 „ „ 1,68 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,68 . 4 Millionen Stäbe
„ 1 ccm „ „ B „ 6,72 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 134,4 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 4838 „ „

Resultat der Versuche 2a und 2b:

Nach 47¼ Stunden waren gebildet aus 26,5 Millionen Sporen = 4838 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,89 Proz. Harnstoff = 94,5 Proz. des zugesetzten Harnstoffes.

Gesamtresultat beider Versuchsreihen:

a) Vermehrung.

27,2 Millionen Sporen der 21. Kulturgeneration bildeten in 47 Stunden 4780 Millionen Stäbchen.

26,5 Millionen Sporen der 101. Kulturgeneration bildeten in 47¼ Stunden 4838 Millionen Stäbchen.

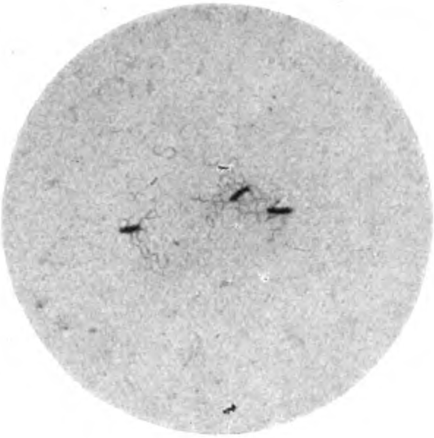
b) Spaltungsgröße.

4780 Millionen Stäbchen spalteten in 2-proz. Harnstoffbouillon 1,815 Proz. Harnstoff.

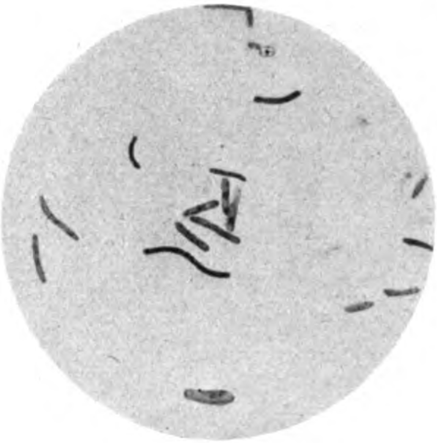
4838 Millionen Stäbchen spalteten in 2-proz. Harnstoffbouillon 1,89 Proz. Harnstoff.

Centralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. 39.

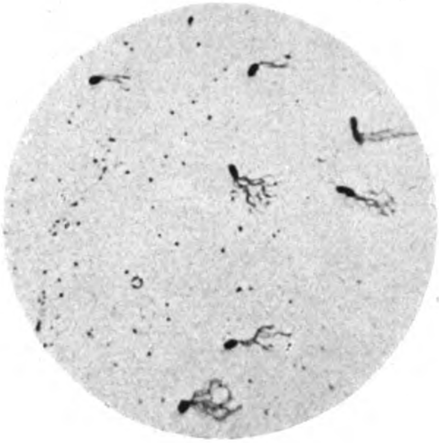
***Kellermann, McBeth, Scales** and **Smith,** Cellulose-Dissolving Bacteria.* *Plate II.*



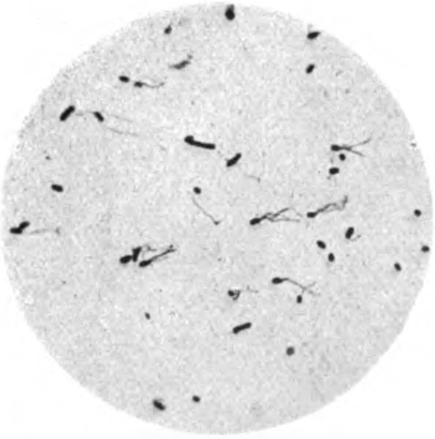
5.



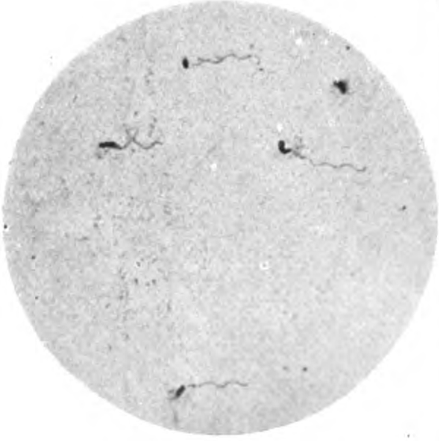
6.



7.



8.



9.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß das Spaltungsvermögen durch die andauernde Züchtung auf harnstoffreiem Nährboden nicht verändert wird.

Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Züchtung bei 42° C, dem Temperaturmaximum für Sporenbildung.

Zu den Versuchen ging ich zuerst von kräftigem Oidienmaterial der 30. Kulturgeneration auf Ammon-Agar aus, impfte dann das Material 15-mal hintereinander nahezu täglich bei 42°, der Maximaltemperatur für die Sporenbildung, auf Ammon-Agar über. Bei dieser Temperatur wurde die Entwicklung geschwächt und wurden nur wenig Sporen ausgebildet; die Sporenbildung trat nachträglich, wenn die Kulturen bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, wieder reichlicher ein.

Versuchsmaterial: Sporen der 45. zuerst bei 28°, später bei 42° C gezüchteten Kulturgeneration auf Ammon-Agar.

Versuch a). Sporenzählung.
Zählmischung (2): 1 ccm der Sporenmischung (1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 5.

Resultat der Zählung:
Auf 160 Quadrate kamen 82 Sporen
„ 1 „ „ 0,512 „
„ 1 ccm der Zählmischung „ 0,512 . 4 = 2,048 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ Sporenmischung „ 2,048 . 5 = 10,24 „ „
„ 0,975 ccm „ „ „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Stäbchenzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
a) Harnstoffspaltung. Versuchsdauer 44 Stunden.
Impfmenge: 0,975 ccm = 10 Millionen Sporen (Sporenmischung 1).

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,975 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 35,975 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 34,975 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm zur Zählung titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . . 3,1 ccm n/KOH
20 ccm ster. 2-proz. Harnst.-Bouill. erf. 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 44 Stunden waren also gebunden 11,7 ccm n/H_2SO_4 = 0,351 g Harnstoff = 1,755 Proz. Harnstoff = 87,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch b). Stäbchenzählung.
Zählmischung (B): 1 ccm der Stäbchenmischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 26.

Resultat der Zählung:
Auf 100 Quadrate kamen 206 Stäbchen
„ 1 „ „ 2,06 „
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 2,06 . 4 = 8,24 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ Sporenmischung „ 8,24 . 26 = 2142 Millionen Sporen

Resultat der Zählung:
Auf 60 Quadrate kamen 139 Stäbchen
„ 1 „ „ 2,32 Stäbchen
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 2,32 . 4 = 9,28 Millionen
„ 1 ccm „ Stäbchenmischung „ 9,28 . 26 = 241,28 Millionen
„ 36 ccm „ „ „ 8686 Millionen Oidien
(Aufteilung in Septen)
„ 36 ccm „ „ „ 4343 Millionen Oidien
(Aufteilung in 1-lange)

Endresultat: Nach 44 Stunden waren aus 10 Millionen Sporen 4343 Millionen Stäbchen entstanden und in 2 Proz. Harnstoffbouillon gespalten 1,755 Proz. Harnstoff = 87,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Da dieses Resultat der Spaltungs- und Vermehrungsgröße mit den Resultaten der anderen Versuche (siehe die Tabelle X) durchaus übereinstimmt, kann von einer Schwächung des Harnstoffspaltungsvermögens durch Züchtung der Kultur bei 42° C nicht die Rede sein, auch die Entwicklungskraft ist nicht verändert.

Tabelle X.

Versuchsmaterial	Sporenimpfmenge in Mill.	Versuchsdauer in Std.	Gespalten von 2% Harnstoff %	Stäbchenzahl in Mill.	Art der Zählung
St. A. 19 Kg. aus 1 Spore auf Ammon-Agar . .	6,5	47	78	3586	durchschnittliche Länge einzelliger Oidien
St. A. 19 Kg. aus 1 Spore auf 2% Harnstoff-Agar	6,6	47¼	84	4234	„
St. A. 21 Kg. aus 1 Kolonie auf Ammon-Agar . .	27,2	47	90,75	4780	ein-lange Oidien
St. A. 101 Kg. aus 1 Kolonie auf Ammon-Agar	26,5	47¼	94,5	4838	„
St. A. 45 Kg. (15 G. bei 42°) auf Ammon-Agar . .	10	44	87,5	4343	„

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die Größe der Harnstoffspaltung von Kulturverhältnissen wie auch von Impfverhältnissen abhängig ist.

A. Kulturverhältnisse. Einen Einfluß auf die Spaltungsgröße übten aus:

a) die Zusammensetzung der Kulturlösung,
b) die Versuchsdauer,
c) die Versuchstemperatur,
d) Luftzufuhr (?).

B. Impfverhältnisse. Einen Einfluß übten aus:

a) Entwicklungszustand des Impfmaterials,
b) Menge des Impfmaterials.
Keinen Einfluß auf die Spaltungsgröße übten aus:
c) Gleichlange Züchtung auf Harnstoff-haltigem und Harnstoff-freiem Nährboden,
d) verschieden lange Züchtung auf Harnstoff-freiem Nährboden,
e_1) Züchtung eines Stammes unter bestimmten Bedingungen aus Kolonien,
e_2) Züchtung eines Stammes unter den gleichen Bedingungen aus einer einzelnen Spore,
f_1) Züchtung eines Stammes bei 28° C, dem Temperaturoptimum für Sporenbildung,
f_2) Züchtung desselben Stammes bei 42° C, dem Temperaturmaximum für Sporenbildung.

Da sich nun herausstellte, daß die die Größe der Harnstoffspaltung beeinflussenden Faktoren auch das Wachstum, d. h. die Vermehrungsgröße mindestens in annähernd gleichem Maße günstig oder ungünstig beeinflussen, so ergibt sich schon daraus, daß die Größe der Harnstoffspaltung im wesentlichen abhängig ist von der Vermehrungsgröße. Die Resultate der folgenden wie auch die der später (p. 325—341) mit den verschiedenen Stämmen unternommenen umfangreichen Versuche zeigen diese Abhängigkeit ganz deutlich.

Spezielle Versuche über die Abhängigkeit der Spaltungsgröße von der Vermehrungsgröße.

I. Versuchsreihe.

Sporenzählung.

Hauptversuch, durch den die zahlenmäßige Menge des Impfmaterials bestimmt wurde, das zur Feststellung der Harnstoffspaltungsgröße Verwendung fand.

Versuchsmaterial: Bac. probatus, ausgereiftes Sporenmaterial der 41., auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturgeneration.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) + 1 ccm Kupferoxydammoniak
Mischung 3: 1 ccm „ „ (1) + 1 ccm H_2SO_4 (5 Proz.)

Zählung der Mischung 2:	Auf	20 Quadrate	kamen	26	Sporen
„ „ „ 2:	„	20 „	„	26	„
„ „ „ 2:	„	20 „	„	28	„
„ „ „ 3:	„	20 „	„	29	„
Resultat:	„	80 „	„	111	„
„	„	1 „	„	1,3875	Sporen
„	„	1 ccm	„	1,3875 . 4	Millionen Sporen
„	„	1 ccm	„	5,55	Millionen Sporen
„ bzgl. d. Mischg. 1	„	1 ccm	„	11,1	„ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Harnstoffspaltung = Bestimmung der Harnstoffspaltungsgröße in bestimmten Zeitabständen.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Bac. probatus, abgekochtes Sporenmaterial der Sporenmischung (1) des 1. Hauptversuches, angestellt mit Sporen der 41. Kulturgeneration.

Versuchstemperatur: 28° C.

Versuch 1a.

Impfmenge: 0,5 ccm der Sporenmischung (1) = 5,55 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 20 Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Impfmenge betrug 0,5 ccm der Sporenmischung (1) = 5,55 Millionen Sporen.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
0,5 ccm Impfmaterial
10 ccm Säure
= 30,5 ccm

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Keimzählung Verwendung fand, titriert.

Titrierflüssigkeit	29,5	ccm
Davon wurden vorgelegt	10,00	ccm n/H_2SO_4
Es wurden erfordert	8,3	ccm n/KOH
Es sind verbraucht	1,7	ccm n/H_2SO_4
20 ccm steril. Bouill. erforderten .	0,2	ccm n/H_2SO_4

Nach 20 Stunden wurden gebunden 1,5 ccm n/H_2SO_4 = 0,045 g Harnstoff
= 0,225 Proz. Harnstoff
= 11,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge

Keimzählung = Bestimmung der in gewissen Zeitabständen gebildeten Stäbchenzahl.

Versuch 1 b.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 1 a.
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak.
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 121 Stäbchen
„ 1: „ 20 „ „ 120 „
„ 2: „ 20 „ „ 121 „
Resultat: „ 60 „ „ 362 „
„ „ 1 „ „ 6,03 „
„ „ 1 ccm der Mischung B kamen 6,03 . 4 Millionen Stäbchen
„ „ 1 ccm „ „ B „ 24,12 „ „
„ „ 1 ccm „ „ A „ 48,24 „ „
„ „ 30,5 ccm „ „ A „ 1471 „ „

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b.

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 5,55 Millionen Sporen 1471 Millionen Stäbchen, und nach 20 Stunden waren gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,225 Proz. Harnstoff.

Versuch 2 a.
Impfmenge: 1,0 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Mill. Sporen.
Versuchsdauer: 23 Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 31 ccm Flüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Keimzählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt: 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden erfordert: 7,2 ccm n/KOH
Zur Bindung des entwickelten NH_3 waren demnach verbraucht: 2,8 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile Harnstoffbouillon erforderten: 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 23 Stunden waren also gebunden: 2,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,078 g Harnstoff
= 0,39 Proz. Harnstoff
= 19,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 2 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 2 b.
+ 1 ccm 20-proz. Kalilauge.
Zählung 1: auf 20 Quadrate kamen 134 Stäbchen
„ 1: „ 20 „ „ 144 „
„ 2: „ 20 „ „ 142 „
Resultat: „ 60 „ „ 420 „
„ „ 1 „ „ 7 „
„ „ 1 ccm der Mischung B kamen 7 . 4 Millionen Stäbchen
„ „ 1 ccm „ „ B „ 28 „ „
„ „ 1 ccm „ „ A „ 56 „ „
„ „ 31 ccm „ „ A „ 1736 „ „

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 1736 Millionen Stäbchen, und nach 23 Stunden waren gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,39 Proz. Harnstoff.

Versuch 3 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 45½ Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . .	15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden erfordert .	5,9 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach	9,1 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile Harnstoffbouillon erfordern	0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 45½ Stunden waren also gebunden	8,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,267 g Harnstoff = 1,335 Proz. Harnstoff = 66,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 3 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 3 a.
+ 1 ccm 20-proz. Kalilauge.

Zählung 1:	Auf	20	Quadrate	kamen	116	Stäbchen
„ 1:	„	20	„	„	120	„
„ 1:	„	20	„	„	124	„
„ 2:	„	20	„	„	126	„
Resultat:	„	80	„	„	486	„
„	„	1	„	„	6,075	„

Resultat:	Auf	1 ccm	der	Mischung	B	kamen	6,075.4	Millionen	Stäbchen
	„	1 ccm	„	„	B	„	24,3	,	„
	„	1 ccm	„	„	A	„	48,6	„	„
„	„	36 ccm	„	„	A	„	1750	„	„

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:

Nach 45½ Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 1750 Millionen Stäbchen, und nach 45½ Stunden waren gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,335 Proz. Harnstoff.

Die niedrige Keimzahl = 1750 Stäbchen nach 45½ Stunden wird durch folgende Beobachtungen erklärlich: Es waren viele, z. T. recht lange Fäden vorhanden, die meist weder Zelligkeit noch Stäbigkeit zeigten und deshalb als ein einzelnes Stäbchen gezählt wurden; es hatte zwar nahegelegen, die Fäden durch die Normalgröße der Oidien oder durch die einfache bis doppelte Sporangiengröße zu teilen, ich habe aber aus Gründen, die bei der Beschreibung der Zählmethode näher angeführt sind, davon abgesehen.

Versuch 4 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 46½ Stunden.
Vorgelegt wurden: 25 ccm n/H_2SO_4; das in besonderer Vorlage entwickelte NH_3 wurde durch einen Luftstrom in die Säure-Vorlage übergetrieben.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
= 21 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 20 ccm Versuchsflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, mit Alkohol und überschüssigem Alkali versetzt, das entwickelte NH_3 dann durch einen Luftstrom in die Säure-Vorlage übergetrieben.

Im Überschuß waren vorgelegt . .	25	ccm n/H_2SO_4	
Zur Neutralisation wurden erfordert	16	ccm n/KOH	
Verbraucht waren demnach . . .	9	ccm n/H_2SO_4	
20 ccm sterile Harnstoffbouillon erfordern	0,2	ccm n/H_2SO_4	
Nach 46½ Stunden waren also gebunden	8,8	ccm n/H_2SO_4	= 0,264 g Harnstoff = 1,32 Proz. Harnstoff = 66 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 4 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 4 a.
+ 1 ccm Methylenblaulösung (1 + 10).
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 297 Stäbchen
„ 2: „ 20 „ „ 307 „
Resultat: „ 40 „ „ 604 „
„ „ 1 „ „ 15,01 „
„ „ 1 ccm der Mischung B kamen 15,01 . 4 Millionen Stäbchen
„ „ 1 ccm „ „ B „ 60,04 „ „
„ „ 1 „ „ A „ 120,08 „ „
„ „ 21 ccm „ „ A „ 2522 „ „

Endresultat der Versuche 4 a und 4 b:

Nach 46½ Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 2522 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,32 Proz. Harnstoff.

Die Spaltungsgröße = 1,32 Proz. Harnstoff in 46½ Stunden ist geringer als die in Versuch 3 beobachtete, was folgende Ursache hat: Bei der im Versuch 4 a gewählten Anordnung mußte das Kulturgefäß zur Entnahme des Zählungs-Kubikzentimeters geöffnet werden; die dabei eingetretene Verdunstung von NH_3 macht sich am Endresultate deutlich bemerkbar.

Versuch 5 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 47 Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der znr Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . .	15	ccm n/H_2SO_4	
Zur Neutralisation wurden erfordert	5,35	ccm n/KOH	
Verbraucht wurden demnach . . .	9,65	ccm n/H_2SO_4	
20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern	0,2	ccm n/H_2SO_4	
Nach 47 Stunden waren also gebunden	9,45	ccm n/H_2SO_4	= 0,2835 g Harnstoff = 1,4175 Proz. Harnst. = 70,9 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 5 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung des Versuches 5 a.
+ 1 ccm 20-proz. Kalilauge.
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 150 Stäbchen
„ 1: „ 20 „ „ 153 „
„ 2: „ 20 „ „ 150 „
Resultat: „ 60 „ „ 453 „
„ „ 1 „ „ 7,55 „

Resultat: Auf 1 ccm der Mischung B kamen 7,55 . 4 Millionen Stäbchen
„ „ 1 ccm „ „ B „ 30,2 „ „
„ „ 1 ccm „ „ A „ 60,4 „ „
„ „ 36 ccm „ „ A „ 2174 „ „

Endresultat der Versuche 5 a und 5 b:

Nach 47 Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 2174 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,4175 Proz. Harnstoff.

Versuch 6 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 11,1 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 60 Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Schütteln und Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt: . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation wurden benötigt 3,9 ccm n/KOH
Verbraucht wurden demnach . . . 11,1 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 60 Stunden waren also gebunden . . . . 10,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,327 g Harnstoff
= 1,635 Proz. Harnstoff
= 81,8 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 6 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 6 a.
+1 ccm 20-proz. Kalilauge.
Zählung 1: Auf 20 Quadrate kamen 179 Stäbchen
„ 1: „ 20 „ „ 185 „
„ 2: „ 20 „ „ 182 „
Resultat: Auf 60 Quadrate kamen 546 Stäbchen
„ 1 „ „ 9,1 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 9,1 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 36,4 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 72,8 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 2621 „ „

Endresultat der Versuche 6 a und 6 b:

Nach 60 Stunden waren gebildet aus 11,1 Millionen Sporen 2621 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,635 Proz. Harnstoff.

II. Versuchsreihe.

Versuchsmaterial: Bac. probatus, ausgereiftes Sporenmaterial der 41., auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturgeneration.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) dieser Versuchsreihe.
+ 1 ccm Kupferoxydammoniak.
Zählung der Mischung 2: Auf 400 Quadrate kamen 718 Sporen
„ „ „ 2: „ 20 „ „ 38 „
„ „ „ 2: „ 20 „ „ 40 „
„ „ „ 2: „ 20 „ „ 38 „
Resultat: „ 460 „ „ 834 „
„ 1 „ „ 1,813 Sporen

Auf 1 ccm kamen 1,813 . 4 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ 7,252 „ „
Resultat bzgl. d. Misch. 1 „ 1 ccm „ 14,5 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff.

Impfmaterial: Bac. probatus, abgekochtes Sporenmaterial der Sporenmischung (1) der 2. Versuchsreihe, angestellt mit Sporen der 41. Kulturgeneration.

Versuchstemperatur: 28° C.

Versuch 1 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 15 Stunden.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 4,8 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 15 Stunden war also keine Säure gebunden, d. h. es war noch keine meßbare Menge NH_3 entwickelt.

Versuch 1 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 1 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 5.
Zählung: Auf 25 Quadrate kamen 71 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 2,84 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,84 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 11,36 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 56,8 „ „
„ 26 ccm „ „ A „ 1477 „ „

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 15 Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 1477 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon nicht nachweisbare Mengen Harnstoff.

Versuch 2 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 20 Stunden.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 4,5 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 0,5 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Nach 20 Stunden waren also gebunden . . . . 0,3 ccm H_2SO_4 = 0,009 g Harnstoff
= 0,045 Proz. Harnstoff
= 2,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 2 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 2 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 5.
Zählung: Auf 25 Quadrate kamen 76 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 3,04 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 3,04 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 12,16 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 60,80 „ „
„ 26 ccm „ „ A „ 1581 „ „

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 1581 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,045 Proz. Harnstoff.

Versuch 3 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 25 Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung B, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 31 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 30 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 7,4 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 2,6 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 25 Stunden waren also gebunden . . . . 2,4 ccm n/H_2SO_4 = 0,072 g Harnstoff
= 0,36 Proz. Harnstoff
= 18 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge

Versuch 3 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 3 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 7.

Zählung	1:	Auf	20	Quadrate	kamen	31	Stäbchen
„	1:	„	20	„	„	40	„
„	1:	„	20	„	„	37	„
„	1:	„	20	„	„	36	„
„	1:	„	20	„	„	46	„
„	1:	„	20	„	„	37	„
„	1:	„	20	„	„	46	„
„	1:	„	20	„	„	32	„
„	2:	„	20	„	„	36	„
„	2:	„	20	„	„	43	„
„	2:	„	20	„	„	37	„
„	2:	„	20	„	„	49	„
„	2:	„	20	„	„	45	„
„	2:	„	20	„	„	47	„
„	2:	„	20	„	„	37	„
„	2:	„	20	„	„	47	„

Resultat: Auf 320 Quadrate kamen 645 Stäbchen
„ 1 „ „ 2,01 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,01 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 8,04 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 56,28 „ „
„ 31 ccm „ „ A „ 1735 „ „

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:

Nach 25 Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 1735 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. ster. Harnstoffbouillon 0,36 Proz. Harnstoff.

Versuch 4 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 41¾ Stunden.
Vorgelegt wurden: 10 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung B, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 31 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 30 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt .	10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . .	1,5 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . .	8,5 ccm n/H_2SO_4
20 ccm 2proz. steriler Harnstoffbouillon erfordern	0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 41¾ Stunden waren also gebunden	8,3 ccm n/H_2SO_4 = 0,249 g Harnstoff = 1,245 Proz. Harnstoff = 62,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 4 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 4 a.
+ Zählzusatz
Verdünnung: 1 = 5.

Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 1758 Stäbchen
„ 2: „ 20 „ „ 79 „
Resultat: „ 420 „ „ 1837 „
„ 1 „ „ 4,37 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 4,37 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 17,48 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 87,4 „ „
„ 31 ccm „ „ A „ 2710 „ „

Endresultat der Versuche 4 a und 4 b:

Nach 41¾ Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 2710 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,245 Proz. Harnstoff.

Versuch 5 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 46¼ Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.
Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 4 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 11 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 46¼ Stunden waren also gebunden . . . . 10,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,324 g Harnstoff
= 1,62 Proz. Harnstoff
= 81 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 5 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 5 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 15.

Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 707 Stäbchen
„ 2: „ 20 „ „ 35 „
Resultat: „ 420 „ „ 742 „
„ 1 „ „ 1,766 Stäbchen
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,766 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 7,06 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 7,06 . 15 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 106 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 3816 „ „

Endresultat der Versuche 5 a und 5 b:

Nach 46¼ Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 3800 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,62 Proz. Harnstoff.

Versuch 6 a. (Harnstoffspaltung.)
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung (1) = 14,5 Millionen Sporen.
Versuchsdauer: 49½ Stunden.
Vorgelegt wurden: 15 ccm n/H_2SO_4.

Die Mischung A, bestehend aus: 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

wurde nach kräftigem Umschütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschusse waren vorgelegt . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 4,1 ccm n/KOH
Verbraucht waren demnach . . . 10,9 ccm n/H_2SO_4
20 ccm sterile 2proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 49½ Stunden waren also gebunden . . . . 10,7 ccm n/H_2SO_4 = 0,321 g Harnstoff
= 1,605 Proz. Harnstoff
= 80 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuch 6 b. (Keimzählung.)
Mischung B: 1 ccm der Mischung A des Versuches 6 a.
+ Zählzusatz.
Verdünnung: 1 = 15.

Zählung: Auf 25 Quadrate kamen 44 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 1,76 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,76 . 4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ B „ 7,04 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 7,04 . 15 „ „
„ 1 ccm „ „ A „ 1056 „ „
„ 36 ccm „ „ A „ 3802 „ „

Endresultat der Versuche 6 a und 6 b:

Nach 49½ Stunden waren gebildet aus 14,5 Millionen Sporen 3802 Millionen Stäbchen, und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,60 Proz. H.

Gesamtresultat.

Tabelle XI.

Versuchsmaterial	Sporenimpfmenge in Mill.	Versuchsdauer in Std.	Gespalten von 2% Harnstoff %	Stäbchenzahl in Mill.	Art der Zählung
I. Versuchsreihe.					
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	5,5	20	11,25	1471	zellige u. fädige Oidien
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	23	19,5	1736	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	45½	66,75	1750	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	46½	66	2522	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	47	70,9	2174	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	11,1	60	81,8	2621	„
II. Versuchsreihe.					
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	15	0	1477	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	20	2,25	1581	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	25	18	1735	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	41¾	62,25	2710	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	46¼	81	3816	„
St. A. 41 Kg. auf Ammon-Agar	14,5	49½	80	3802	„

(siehe auch **Fig. 1** u. 2 der Kurventafel p. 336.)

Kapitel 10.

Beschreibung der mir übermittelten Originalkulturen. Vergleich mit meinem Originalstamm.

Beschreibung der mir von anderen Autoren übermittelten Originalkulturen und ihr Vergleich mit dem von mir isolierten Stamme.

Ich habe mich bemüht, alle in der Natur aufgefundenen und beschriebenen Arten mit Harnstoffspaltungsvermögen zu erhalten, um sie untereinander und auch mit dem von mir isolierten Harnstoffspalter zu vergleichen.

Von den als nicht sporenbildend in der Literatur beschriebenen Harnstoffbakterien erhielt ich folgende Kulturen: Bacillus erythrogenes, B. Kirchneri, B. lipsiense = Originalstämme Löhnis; B. erythrogenes = Originalstamm Söhngen, Micrococcus candicans Flügge (Originalstamm); Bacillus a—e = Originalstämme Christensen; Urobacillus Miquelii Beijerinck (Král).

Da es mir weder gelang, in den Kulturen Sporen zu finden, noch mir möglich war, durch Fortzüchtung auf günstigen Nährböden Sporen zu erhalten, so sah ich von der Weiterbearbeitung dieser Bakterien ab.

Von den Miquelschen 60 Arten (siehe später) habe ich keine einzige erhalten können, da — wie mir der Autor freundlicherweise mitteilte — alle Kulturen eingegangen sind. Auch die von Leube und Burri isolierten Arten waren nicht mehr zu erhalten.

Von sporenbildenden Harnstoffbakterien erhielt ich eine Originalkultur des von Beijerinck isolierten „Urobacillus pasteurii (Miquel) Beijerinck“, eine von Král weitergezüchtete Kultur des Beijerinckschen Originalstammes von „Urobac. leubei Beijerinck“, eine von Löhnis weitergezüchtete Kultur des von Král bezogenen Beijerinckschen Originalstammes: Urobac. pasteurii (Miquel) Beijerinck und schließlich Kulturen der Stämme: 1. A_{4a}, 2. B_2, 3. B_3 des von Löhnis isolierten „Bacillus Pasteuri (Miquel) Migula“ und Kulturen der Stämme I und III des von Löhnis isolierten „Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula“.

Die mir von Beijerinck und Král übermittelten Kulturen enthielten genügend Sporen; dagegen waren die mir von Löhnis übersandten Kulturen durch ungünstige Umstände, wie mir Herr Prof. Löhnis brieflich mitteilte, stark geschwächt worden: Der Stamm B_2 des „Bac. Pasteuri“ enthielt gar keine Sporen, es gelang mir auch nicht, ihn zur Sporenbildung zu bringen. Die anderen Stämme enthielten nur ganz vereinzelt Sporen; eine Abkochung des Sporenmaterials bei der Umimpfung zur Stärkung des Sporenbildungsvermögens habe ich bald unterlassen, da diesbezügliche Versuche (siehe auch p. 218) keine Vorteile boten. Dagegen gelang es mir durch längere, fast tägliche Strichüberimpfung ganz jungen Oidienmaterials dieser Stämme auf günstige Nährböden (siehe weiter unten) diese so zu kräftigen, daß genügend Sporen ausgebildet wurden; am wenigsten kräftig blieb der Stamm A_{4a}, Stäbchen und Sporen waren sehr klein und Sporen in so geringer Zahl, daß ich von der Festlegung einer Kurve für die Sporengröße und von der Bestimmung der Harnstoffspaltungsgröße absehen mußte.

Um die mir übermittelten Kulturen mit meinem Harnstoffspalter vergleichen zu können, habe ich sie der eingangs geschilderten „allgemeinen Vorbehandlung“ unterworfen; ich brachte die Kulturen auf drei verschiedene Nährböden:

1. ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Ammoniumkarbonat + 0,1 Proz. Natriumkarbonat
2. ⅓ „ + 0,2 „ Harnstoff + 0,1 „ „
3. ⅓ „ + 2 „ „ + 0,1 „ „

und züchtete sie durch meist tägliche Überimpfung auf diesen Nährböden mindestens 4 Wochen lang fort. Die genannten Nährböden hatten sich von den vielen mit zur Kultur herangezogenen Nährböden (siehe p. 214) am besten bewährt.

Der Vergleich der „normal vorbehandelten“ Kulturen untereinander und mit meinem Originalstamm erstreckte sich zunächst auf ihr makroskopisches und ihr mikroskopisches Aussehen.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Kulturelle Eigenschaften.

Das Kulturbild der verschiedenen Stämme war durchaus einheitlich und entsprach auch dem meines Originalstammes. Der Beijerincksche Originalstamm wuchs auf den harnstoffhaltigen Nährböden etwas besser als auf dem harnstoffreien Ammon-Agar; der Stamm war augenscheinlich besonders an den Harnstoff angepaßt. Auf neutralen Agar- und Gelatinenährböden, die in alkalifreien Kulturröhren ausgegossen waren, fand kein Wachstum statt. Auf Kartoffel und Möhre konnte nur dann Wachstum beobachtet werden, wenn diesen Nährböden Kreide zugesetzt war; auch hier zeigte der Beijerincksche Originalstamm des „Urobac. pasteurii" das schwächste Wachstum. In völlig neutraler Bouillon oder Nährlösung I, die ebenfalls in alkalifreien Kulturröhren aufbewahrt wurde, fand kein Wachstum statt. In asparaginhaltiger M-Nährlösung (Nährlösung IV) fand auf Zusatz von Ammonkarbonat (0,5 Proz.) deutliches Wachstum statt, zumal bei Einimpfung von jungem Oidienmaterial; auf Zusatz von Dextrose (2 Proz.) wurde das Wachstum noch etwas kräftiger; am stärksten war es in Bouillon mit 1 Proz. Pepton und bis 1 Proz. Ammonkarbonat oder bis 2 Proz. Harnstoff.

Morphologische Eigenschaften.

Die Form und Größe der Sporen des Beijerinckschen „Urobac. pasteurii", wie auch des Stammes B_3 „Bac. Pasteuri" von Löhnis glichen der bei den Sporen meines Originalstammes beobachteten. Der „Urobacillus leubei" zeigte nur insofern eine geringe Abweichung, als hier mehr längliche Sporen beobachtet wurden, wie dies auch aus den Kurven zu ersehen ist. Der mir von Löhnis übermittelte Stamm des „Urobac. pasteurii Beijerinck" neigte übrigens auch dazu, längliche Sporen neben runden auszubilden.

„Bacillus Freudenreichii" hatte viel kleinere Sporen als die genannten Stämme, nur der Stamm A_{4a} Löhnis des „Bacillus Pasteuri" zeigte ähnliche Größenverhältnisse.

Zur Festlegung der Kurven für die Sporengrößen der verschiedenen Stämme wurde jeweils die 30., auf Ammon-Agar gewachsene Kulturgeneration benutzt; außerdem wurden bei einigen Stämmen (siehe unten) auch noch andere Nährböden herangezogen. Auch hier wurde bei Aufstellung der Zahlen für Sporenlänge und Sporenbreite die Größe der kugeligen Sporen in gleicher Weise berücksichtigt und zwar so, daß bei einer kugeligen Spore z. B. der Größe 0,9 μ sowohl die Länge, als auch die Breite mit 0,9 μ berechnet wurde. In dem Falle, wo die Sporen z. T. ausgesprochen länglich sind, fallen auch die Kurvenspitzen nicht zusammen (siehe die Kurvenspitze von „Urobac. leubei" Fig. 3 p. 321).

1. „Urobacillus pasteurii", Beijerincks Originalstamm = Stamm D des B. probatus A. M. et Viehoever.

A. Variationskurve für Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden 60 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

	Sporengröße länglicher Sporen:							Sporengröße kugeliger Sporen:						
Breite	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	μ	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	μ
Länge	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	1,0	μ							
Stück	1	3	4	1	5	1		1	3	9	24	2	1	
Breite	0,8	0,8	08,	μ										
Länge	0,9	1,0	1,0	μ										
Stück	2	2	1											

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 µ	
Breite	2	10	16	29	2	1	Stück	
„	3,3	17	32	49	33	1,7	Proz.	
Länge	1	3	13	29	9	4	1	Stück
	1,7	5	22	49	15	6,7	1,7	Proz.

B. Variationskurve für Sporengröße auf ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Harnstoff.

Es wurden 50 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:

Breite	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9 µ
Länge	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0 µ
Stück	4	3	5	4	3	1

Sporengröße kugeliger Sporen:

	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 µ
Stück	1	1	2	21	3	1	1

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 µ	
Breite	1	5	10	28	4	1	1	Stück . 2 = Proz.
Länge	1	1	2	28	12	5	1	Stück . 2 = Proz.

C. Variationskurve für Sporengröße auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff.

Es wurden 50 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:

Breite	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9 µ
Länge	0,8	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1 µ
Stück	1	7	8	6	2	2	1

Sporengröße kugeliger Sporen:

	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 µ
Stück	1	2	15	4	1

Größe	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1 µ	
Breite	2	16	23	7	1		Stück . 2 = Proz.
Länge	1	2	24	18	5	1	„ . 2 = „

Resultat des Wachstums auf den verschiedenen Nährböden:

Ein wesentlicher Unterschied in der Sporengröße der auf den verschiedenen Nährböden gewachsenen Kulturen konnte nicht festgestellt werden.

2. „Bacillus Pasteuri (Miquel) Migula", Stamm B_3 Löhnis. = Stamm C des B. probatus.

A. Variationskurve für Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden gemessen 25 Sporen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:

Breite	0,6	0,6	0,6	0,7	0,8 µ
Länge	0,7	0,8	0,9	0,8	1,0 µ
Stück	1	1	1	1	1

Sporengröße kugeliger Sporen:

	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 µ
Stück	1	1	4	10	3	1

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 µ	
Breite	1	4	5	11	3	1	Stück . 4 = Proz.
Länge	1	2	5	11	4	2	„ . 4 = „

B. Sporengröße auf Kartoffel-Kreidekultur.

Die Größe der gezeichneten Sporen betrug:

Längliche Sporen:

Breite	0,6	0,6 µ
Länge	0,7	0,8 µ
Stück	1	1

Kugelige Sporen:

	0,5	0,7	0,8 µ
Stück	1	2	1

Resultat: Auf Kartoffel-Kreidenährboden wurden weniger und etwas kleinere Sporen ausgebildet.

3. „Urobacillus leubei" Beijerinck (Král) = Stamm B des B. probatus.

Variationskurve der Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden gemessen 100 Sporen, die Messungen ergaben:

Sporengröße länglicher Sporen:

Breite	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9 µ
Länge	0,7	1,0	1,1	0,9	1,0	1,1	0,9	1,0	1,1	1,2	1,0	1,1 µ
Stück	1	4	2	5	3	2	4	10	7	3	3	6

Kugeliger Sporen:

	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0 µ
Stück	3	4	24	17	2

Kurventafel No. 1.

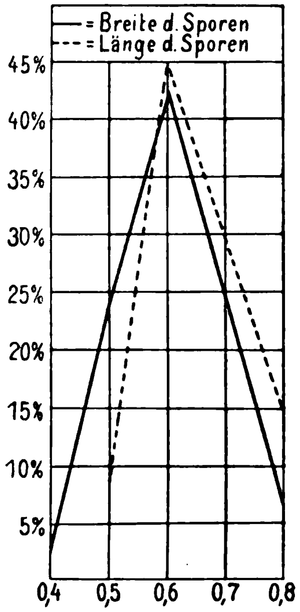


Fig. 1.
B. Freudenreichii.
$^1/_3$ D-Ag. + 0,2 % Amm. carb.

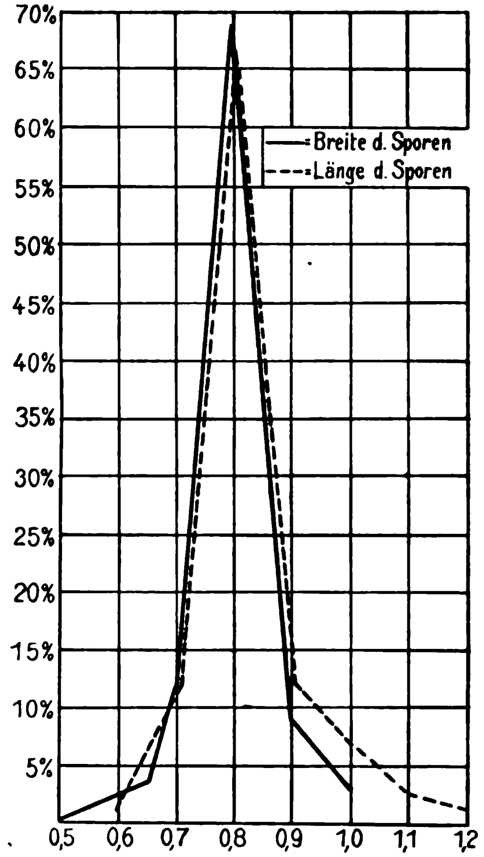


Fig. 2. Stamm A.
$^1/_3$ D-Ag. + 0,2 % Amm. carb.

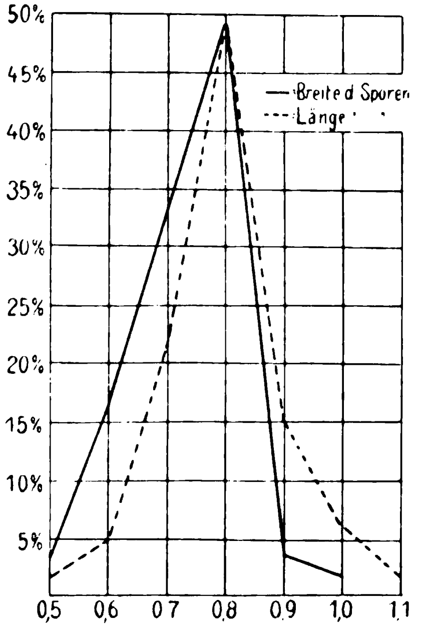


Fig. 5. Stamm D.
⅓ D-Ag. + 0,2 % Amm. carb.

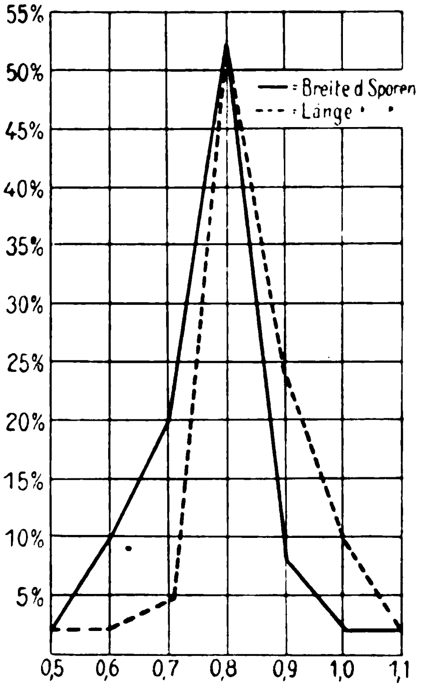


Fig. 6. Stamm D.
⅓ D-Ag. + 0,2 % Harnstoff.

Kurventafel No. 1.

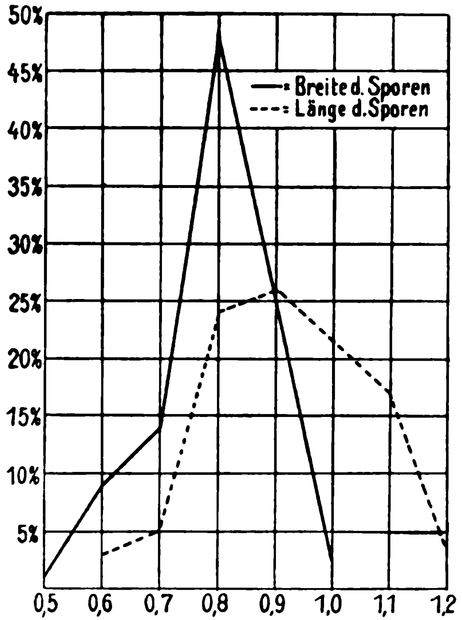


Fig. 3. Stamm B.
$^1/_3$ D-Ag. + 0,2 % Ammon. carb.

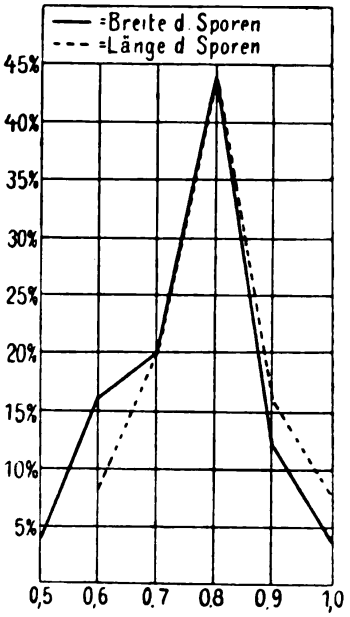


Fig. 4. Stamm C.
$^1/_3$ D-Ag. + 0,2 % Ammon. carb.

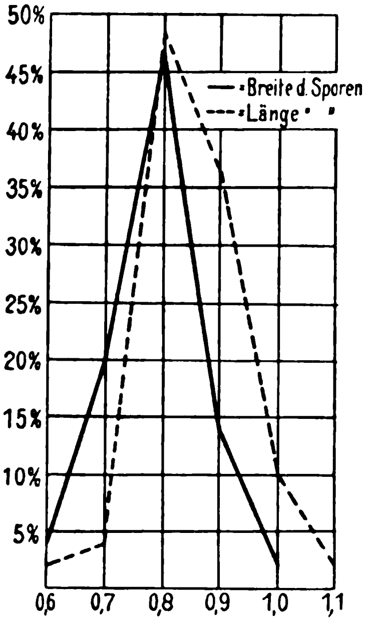


Fig. 7. Stamm D.
$^1/_3$ D-Ag. + 2 % Harnstoff.

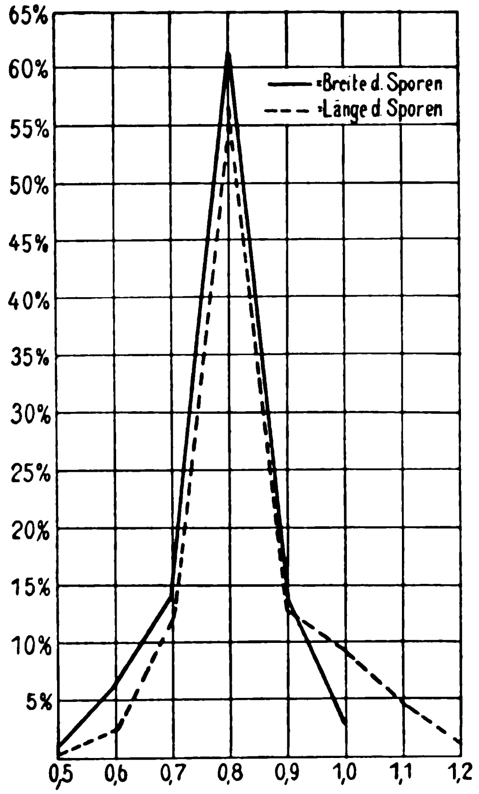


Fig. 8. Stamm A-D.
$^1/_3$ D-Ag. + 0,2 % Ammon. carb.

Größe	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	µ
Breite	1	9	14	48	26	2			Stück
Länge		3	5	24	26	22	17	3	„

4. „Bacillus Freudenreichii“ (Miquel) Migula, Stamm I Löhnis.

A. Variationskurve der Sporengröße auf Ammon-Agar.

Es wurden 33 Sporen gemessen, die Messungen ergaben:

	Sporengröße länglicher Sporen:							Kugeliger Sporen:				
Breite	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,7	µ	0,6	0,6	0,7	0,8	µ
Länge	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	0,8	µ					
Stück	1	1	3	1	1	2		3	13	6	2	

Größe	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	µ
Breite	1	8	14	8	2	Stück . 3 = Proz. (annähernd)
Länge		3	15	10	5	„ . 3 = „ „

B. Sporengröße auf Kartoffel-Kreidenährboden.

Die Größe der auf diesem Nährboden beobachteten Sporen stimmte mit der auf Ammon-Agar beobachteten überein.

Die Oidien und Sporangien der Stämme, mit Ausnahme des Stammes I „Bac. Freudenreichii“ und des Stammes A_{4a} „Bac. Pasteuri“, zeigten in ihrer Größe weitgehendste Übereinstimmung mit denen meines Originalstammes; ihre Breite betrug auf Ammon-Agar meist 0,8 µ, ihre Länge meist 3 µ.

Die Oidien des „Bac. Freudenreichii“ zeigten bei einer Variationsbreite von 0,4—0,8 µ und einer Variationslänge von 1—3,6 µ und mehr meist eine Breite von 0,6 und eine Länge von 2 µ; ebenso zeigten die Sporangien meist eine Breite von 0,6 und eine Länge von 2 µ. Die Oidien und Sporangien des Stammes A_{4a} „Bac. Pasteuri“ zeigten ähnliche Größenverhältnisse.

Die Form der Sporangien war ebenso mannigfach gestaltet wie die der Sporangien meines Originalstammes. Bei dem „Urobac. pasteurii Beijerinck“ herrschte die Clostridienform vor, bei dem „Urobac. leubei Beijerinck“ waren ziemlich viele Sporen nur wenig angeschwollen, die Sporen lagen oft etwas von der Sporangienspitze entfernt.

Die bei meinem Originalstamm beobachteten Involutions-Degenerationsformen und Mikroidien traten auch in diesen Kulturen auf.

Bei allen Stämmen wurden Hemangien, wenn auch nicht so häufig wie bei meinem Originalstamme, beobachtet.

Reservestoffe wurden unter normalen Kulturbedingungen in keinem Falle nachgewiesen.

Die als Kerne angesprochenen, mit Methylenblau sich blau färbenden und mit 1-proz. Schwefelsäure sich wieder entfärbenden Körner konnten in den Oidien aller Stämme nachgewiesen werden.

Die Säure-Alkoholfestigkeit fiel bei allen Stämmen negativ aus.

Eigenbewegung wurde bei allen Stämmen beobachtet; die Geißelfärbung (nach Zettnow) wurde für „Urobac. leubei B.“ mit Erfolg durchgeführt; da Beijerinck (1901) keine gute Geißelfärbung von „Urobac. leubei“ bekam, Miquel (1904. p. 81) die Begeißelung sogar für nicht wahrscheinlich hält, bilde ich einige meiner Präparate ab (Fig. 54).

Die Chitinreaktion (siehe p. 238) wurde mit Erfolg bei allen Morphoden der Stämme „Urobac. pasteurii B.“ und „Urobac. leubei“ durchgeführt (siehe auch A. Viehoever 1912).

Tabelle XII.

Tabelle der Kardinalpunkte für Temperaturen.

	Originalstamm A (B. probatus A. M. et V.)			Stamm B (Urob. leubei B).			Stamm C (B. Pasteurii St. B_3 L.)			Stamm D (Urob. pasteurii Beij.)			B. Freudenreichii Stamm I Löhnis			B. Pasteurii Stamm A$_{4a}$ Löhnis		
	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°	40°	42°	44°
Sporenkeimung	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—
Wachstum	+	+	+ —	+	+	—	+	+	—	+	+	+ —	+	+ —	—	+	—	—
Sporenbildung	+	+	—	+	+	—	+	+ —	—	+	+	—	+	—	—	+	—	—

Tabelle XIII.

Tabelle der Kardinalpunkte für Sauerstoffspannung.

	Sporen-keimung	Wachs-tum	Sporen-bildung	Sporen-keimung	Wachs-tum	Sporen-bildung	Sporen-keimung	Wachs-tum	Sporen-bildung	Sporen-keimung	Wachs-tum	Sporen-bildung	Sporen-keimung	Wachs-tum	Sporen-bildung	Sporen-keimung	Wachs-tum	Sporen-bildung
0 mg Sanerstoff im Liter	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 mg „ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4 mg „ „ „	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
6—10 mg Sauerstoff im Liter	+	+	— +	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+ —	—	+	—	—
17,5—22,5 mg Sauerstoff im Liter	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Biophysikalische Merkmale.

Die Kardinalpunkte der Temperatur für Sporenkeimung, Entwicklung und Sporenbildung (siehe die Tabelle XII) ebenso die Kardinalpunkte der Sauerstoffspannung für die genannten Entwicklungszustände (Tabelle XIII), wie schließlich auch die Tötungszeiten der Sporen bei 100° C (Tabelle XIV) stimmen ungefähr mit den bei meinem Originalstamme beobachteten überein.

Tabelle XIV.
Tabelle der Tötungszeiten.

Im H_2O-Bad bei 100°	Original-stamm A (B. probatus A. M. et V.)	Stamm B (Urob. leubei B.)	Stamm C (B. Pasteurii St. B_3 L.)	Stamm D_2 (B. Pasteurii Beij. Král Löhn.)	Stamm D_0 (Urob. pasteurii Orig. Beij.)	B. Freudenreichii Stamm I Löhnis	B. Pasteurii St. A_{4a} Löhnis
5 Min.	+	+	+	+	+	+	
9 Min.	+	+	+				+
9¼ Min.	+	+	+	+	+		
9½ Min.	+	+		+			
10 Min.	+	+	+	+		+ —	—
10½ Min.	+						
11 Min.	+	makr. — mikr. +	+	—		—	
11½ Min.	+						
12 Min.	—	—	—	—	—	—	
12½ Min.	—						

Biochemische Merkmale.

Schwache Nitritbildung zeigten die Stämme in Nährlösung IV, die mit 1 Proz. Dextrose und 0,5 Proz. Ammonkarbonat versetzt und mit jungem Oidienmaterial geimpft worden war; das relativ stärkste Wachstum und die deutlichste Nitritreaktion zeigte „Urobac. Leubei B.“.

Die Bildung von Schleim und Riechstoffen (Trimethylamin) wurde besonders deutlich in den mit Ammonkarbonat oder Harnstoff versetzten Bouillonkulturen beobachtet.

Gasbildung fand nicht statt. Gelatineverflüssigungsvermögen war nicht bei allen Stämmen zu beobachten: So vermochten „Urobacillus Leubei“ und „Urobacillus Pasteurii Beijerinck“ Ammon-Gelatine = ⅓ D-Gelatine + 0,2 Proz. Ammonkarbonat + 0,1 Proz. Natriumkarbonat nicht zu verflüssigen. „Urobac. Pasteurii B.“ brachte Gelatine (10 Proz.) + 2 Proz. Harnstoff + 0,2 Proz. Ammonkarbonat zum Erweichen, die Gelatine rutschte in den schräg ausgegossenen und dann aufrecht aufbewahrten Kulturen zusammen, ohne verflüssigt zu werden. Der Stamm B_3 des „Bacillus Pasteurii“ (Löhnis) verflüssigte im Anfange der Kultivierung nicht alkalische Nährgelatine ohne Dextrose, nach 2-jähriger Kultivierung verflüssigte er Ammon-Gelatine ebenso stark wie mein Originalstamm. „Bacillus Freudenreichii“ und Stamm A_{4a} verflüssigten nach längerer Kultivierung auf Ammon-Agar ganz schwach die Ammon-Gelatine; nach 4 Monate langem Stehen bei durchschnittlich 17° C waren etwa ½ ccm verflüssigt.

Eine 3 Tage alte, mit kräftigen Schwärmoidien versetzte Bouillonkultur von „Urobacillus Pasteurii B.“ verursachte, zu je 1 ccm in die Halsader einer Katze und eines Kaninchens eingespritzt, keine wesentliche

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Änderung des Blutungsdruckes und der Atemkurve, eine Bildung von Giftstoffen in der Bouillon hatte also nicht stattgefunden (das gleiche Ergebnis hatten ja auch Versuche mit meinem Originalstamme.

Vergleich der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgrößen.

1. Bacillus probatus A. M. et Viehoever Stamm A (Originalstamm).

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach bestimmten Zeiten daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt: der Zählung der Stäbchen wurde die Normal-Sporangiengröße zugrunde gelegt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gewachsenen Kulturgeneration.

a) Sporenzählung.

Mischung 2 (Zählmischung) = 1 ccm der Sporenmischung (Misch. 1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung 2:
Resultat: Auf 400 Quadrate kamen 235 Sporen
„ 1 „ „ 0,5875 Sporen
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 0,5875 . 4 Millionen = 2,35
„ 1 ccm „ Sporenmischung „ 32,90 Millionen Sporen
„ 0,3 ccm „ „ „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 0,3 ccm der Sporenmischung = 10 Millionen Sporen.
1. Versuch. Versuchsdauer 20 Stunden.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,3 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 25,3 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 24,3 ccm Titrierflüssigkeit,

25,3 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm zur Zählung titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . . 14,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 20 Stunden waren also noch keine nachweisbaren Mengen von Harnstoff gespalten.

b) Stäbchenzählung.

Zählmischung (Mischung B): 1 ccm der Stäbchenmischung (M. A.)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung B:
Resultat: Auf 160 Quadrate kamen 165 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,03 „
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 1,03 . 4 Millionen
„ 1 ccm „ Stäbchenmischung „ 4,12 . 14 = 57,68 Millionen
„ 35,3 ccm „ „ „ 2037 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 2037 Millionen Stäbchen, aber in der 2-proz. Harnstoffbouillon noch keine nachweisbaren Mengen Harnstoff gespalten.

Versuch 2. Versuchsdauer 30 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,3 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 25,3 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 24,3 ccm Titrierflüssigkeit.

25,3 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm zur Zählung titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 10 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte Harnstoffbouillon
erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 30 Stunden waren also gebunden 4,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,144 g Harnstoff = 0,720 Proz. Harnstoff = 36 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Stäbchenzählung.

Zählmischung (B): 1 ccm der Stäbchenmischung (A)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung B.

Resultat: Auf 200 Quadrate kamen 366 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,83 „
„ 1 ccm der Zählmischung kamen 1,83 . 4 Mill. = 7,32
„ 1 ccm „ Stäbchenmischung „ 7,32 . 14 = 102,48 Mill.
„ 35,3 ccm „ „ „ 3618 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 3618 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,72 Proz = 36 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Nach 20 Stunden waren rund 2000 Millionen 1-lange Oidien aus 10 Millionen Sporen gebildet, die aber noch keine nachweisbare Menge Harnstoff gespalten hatten, nach 30 Stunden waren rund 3600 Millionen Stäbchen gebildet, die 0,72 Proz. Harnstoff = 36 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gespalten hatten.

2. Bacillus probatus A. M. et Viehoever, Stamm B (Urobacillus leubei Beijerinck, Originalstamm).

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen, wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; der Zählung der Stäbchen wurde in der I. Versuchsreihe die Septenbildung zugrunde gelegt, in der II. Versuchsreihe die Normal-Sporangiengröße.

I. Versuchsreihe.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 6.

Zählung der Mischung 2:
„ 1: Auf 100 Quadrate kamen 45 Sporen
„ 2: „ 140 „ „ 55 „
Resultat: „ 240 „ „ 100 „
„ 1 „ „ 0,417 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,417 . 4 = 1,66 Mill. Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 1,668 . 6 = 10,0 Mill. Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoffbouillon.
Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.
1. Versuch. Versuchsdauer 23 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,

26 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 3,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 23 Stunden waren also gebund. 1,0 ccm n/H_2SO_4 = 0,03 g Harnstoff = 0,15 Proz. Harnstoff = 7,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 8.

Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 80 Quadrate kamen 24 Stäbchen
„ 2: „ 60 „ „ 19 „
Resultat: „ 140 „ „ 43 „
„ 1 „ „ 0,307 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,307.4 = 1,228 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 1,228.8 = 9,824 Mill. Stäbchen
„ 26 ccm „ „ A „ 255 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1a und 1b:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 255 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,15 Proz. Harnstoff = 7,5 Proz. der ges. Harnstoffmenge.

2. Versuch. Versuchsdauer 26 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 3 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 46 Stunden waren also gebunden 11,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,354 g Harnstoff = 1,77 Proz. Harnstoff = 77,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A + Zählzusatz. Verdünnung 1 = 15.

Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 256 Stäbchen
„ 2: „ 160 „ „ 124 „
Resultat: „ 560 „ „ 370 „
„ 1 „ „ 0,66 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,66.4 = 2,64 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 2,64.15 = 39,6 Mill. Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 1426 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 2a und 2b:

Nach 46 Stunden waren aus 10 Millionen Sporen gebildet 1426 Millionen Stäbchen und gespalten waren in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,77 Proz. Harnstoff = 88,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

3. Versuch. Versuchsdauer 46½ Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 46¼ Std. waren also gebunden 10,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,324 g Harnstoff = 1,62 Proz. Harnstoff = 81 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A, 1 = 15 verdünnt, wie in Versuch 2 b.

Zählung der Mischung B.

Zählung 1: Auf 200 Quadrate kamen 108 Stäbchen
„ 2: „ 200 „ „ 143 „
Resultat: „ 400 „ „ 251 „
„ 1 „ „ 0,6275 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,6275.4 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 15.2,51 Millionen Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 1375 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 3a und 3b:

Nach 46½ Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 1375 Millionen Stäbchen, gespalten waren in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,62 Proz. Harnstoff = 81 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

Gesamtresultat der Versuchsreihe I.

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen rund 250 Millionen Stäbchen und Fäden, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,15 Proz. Harnstoff = 7,5 Proz. der gesamten Harnstoffmenge, nach 46 Stunden über rund 1400 Millionen Stäbchen und Fäden, gespalten 1,77 Proz. = 88,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 46½ Stunden in einem anderen Versuche nahezu 1400 Millionen Stäbchen und Fäden, gespalten 1,62 Proz. Harnstoff = 81 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge (Fig. 3 p. 337).

II. Versuchsreihe.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. Kulturgeneration, auf Ammon-Agar gewachsen.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung 2:

Resultat: Auf 400 Quadrate kamen 97 Sporen
„ 1 „ „ 0,2425 Sporen
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,2425 . 4 = 0,97 Mill. Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 0,97 . 14 = 13,58 Mill. Sporen
„ 0,74 ccm „ „ 1 „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoffbouillon.

Versuchstemperatur 28° C.

Impfmenge: 0,74 ccm der Sporenmischung (1) = 10 Millionen Sporen.

1. Versuch. Versuchsdauer 20 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,74 ccm Impfmaterial
+ 4 ccm Säure
= 24,7 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 23,7 ccm Titrierflüssigkeit,

24,7 ccm Flüssigkeit, wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . 4 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 3,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 20 Stunden waren also gebunden . . . . 0,0 ccm n/H_2SO_4 = 0,00 g Harnstoff

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A: 1 = 14 verdünnt (wie die Sporenmischung 2).

Zählung der Mischung B:

Resultat: Auf 200 Quadrate kamen 265 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,325 Stäbchen
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,325 . 4 = 5,3 Mill.
„ 1 ccm „ „ A „ 5,3 . 14 = 74,2 Mill.
„ 24,74 ccm „ „ A „ 1834 Millionen Stäbchen

Endresultate der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 20 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 1834 Millionen Stäbchen, in 2 Proz. Harnstoffbouillon aber noch kein Harnstoff gespalten.

2. Versuch. Versuchsdauer 30 Stunden.

a) Harnstoffspaltung

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,74 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 30,74 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 29,74 ccm Titrierflüssigkeit,

30,74 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . 7 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 30 Stunden waren also gebunden . . . . 2,8 ccm n/H_2SO_4 = 0,084 g Harnstoff
= 0,42 Proz. Harnstoff = 21 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 26.

Zählung der Mischung B:

Resultat: Auf 200 Quadrate kamen 198 Stäbchen
„ 1 „ „ 0,99 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,99 . 4=3,96 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 3,96 . 26=102,96 Mill. Stäbch.
„ 30,74 ccm „ „ A „ 3165 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 3165 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,42 Proz. Harnstoff = 21 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

3. Versuch. Versuchsdauer 44 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,74 ccm Impfmaterial
+ 10 ccm Säure
= 30,74 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 29,74 ccm Titrierflüssigkeit,

30,74 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 10 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,2 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 44 Stunden waren also gebund. 5,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,168 g Harnstoff = 0,84 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A: 1 = 26 verdünnt (wie die Mischung B des zweiten Versuches).

Zählung der Mischung B:
Resultat: Auf 60 Quadrate kamen 71 Stäbchen
„ 1 „ „ 1,183 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,183 . 4=4,732 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 4,732 . 26 = 23 Mill. Stäbchen
„ 30,74 ccm „ „ A „ 3782 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 3 a und 3 b:

Nach 44 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 3782 Millionen Stäbchen, gespalten waren in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,84 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

Gesamtresultat der Versuchsreihe II.

Nach 20 Stunden waren aus 10 Millionen Sporen über 1800 Millionen Stäbchen gebildet, aber noch keine deutlich nachweisbaren Mengen Harnstoff gespalten, nach 30 Stunden waren gebildet rund 3200 Millionen Stäbchen, gespalten 0,42 Proz. Harnstoff = 21 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 44 Stunden waren gebildet rund 3800 Millionen Stäbchen und gespalten 0,84 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge (Fig. 4 p. 337).

3. Bacillus probatus A. M. et Viehoever, Stamm C (Stamm B_3 Löhnis des Bacillus Pasteurii (Miquel) Migula.

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; der Zählung der Stäbchen wurde die Größe des Normal-Sporangiums zugrunde gelegt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration.

Sporenzählung.
Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung 2:
Zählung 1: Auf 160 Quadrate kamen 40 Sporen
„ 2: „ 40 „ „ 10 „
Resultat: „ 200 „ „ 50 „
„ 1 „ „ 0,25 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,25.4 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 0,25.4.14 = 14 Mill.Sporen
„ 0,715 ccm „ „ 1 „ 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur 28° C.
Impfmenge: 0,715 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.
1. Versuch. Versuchsdauer 22 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,7 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 25,7 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 24,7 ccm Titrierflüssigkeit,

25,7 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,8 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 22 Stunden war also noch keine meßbare Menge Harnstoff gespalten.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A = 1 : 14 verdünnt, wie die Sporenmischung 2.
Zählung: Auf 100 Quadrate kamen 51 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 0,51 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,51.4 = 2,4 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 2,4.14 = 33,6 Mill. Stäbchen
„ 25,7 ccm „ „ A „ 864 Millionen Stäbchen

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 22 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 864 Millionen Stäbchen, aber noch keine meßbare Menge Harnstoff gespalten.

2. Versuch. Versuchsdauer 47 Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 0,7 ccm Impfmaterial
+ 9 ccm Säure
= 29,7 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 28,7 ccm Titrierflüssigkeit,

29,7 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 9 ccm n/H_2SO_4
Zus Neutralisation waren nötig . . . 6,3 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 47 Stunden waren also gebunden 2,5 ccm n/H_2SO_4 = 0,075 g Harnstoff = 0,375 Proz. Harnstoff = 18,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.
b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A = 1 : 14 verdünnt (wie die Sporenmischung 2).
Zählung: Auf 400 Quadrate kamen 692 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 1,76 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,76.4 = 6,92 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 6,92.14 = 96,88 Mill. Stäbchen
„ 29,7 ccm „ „ A „ 2877 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 47 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 2877 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,375 Proz. Harnstoff = 18,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Nach 22 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen nahezu 900 Millionen Stäbchen, aber noch keine meßbare Menge Harnstoff gespalten, nach 47 Stunden waren gebildet rund 2900 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,375 Proz. Harnstoff = 18,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge (Fig. 7 p. 336).

4. **Bacillus probatus** A. M. et Viehoever, Stamm D; Stamm **Urobacillus pasteuri** Miquel (**Beijerincks** Originalstamm).

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; bei der Zählung der Stäbchen wurde die Septierung und am Ende die Größe der Normal-Sporangien berücksichtigt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar bei 28° gezüchteten Kulturgeneration.

Sporenzählung.
Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1)
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 5.
Zählung der Mischung 2:
Zählung: Auf 160 Quadrate kamen 80 Sporen
„ „ 1 „ „ 0,5 „
Resultat: „ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,5.4 = 2 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 2.5 = 10 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillion + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.
Versuchsdauer 21 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 15 ccm Säure
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,4 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 21 Stunden waren also gebunden 10,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,327 g Harnstoff = 1,335 Proz. Harnstoff = 81,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Versuchsdauer 22 und 23 Stunden.

Nach diesen Zeiten wurden gebunden 11,5 ccm n/H_2SO_4 = 0,345 g Harnstoff = 1,725 Proz. Harnstoff = 86,1 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Versuchsdauer: 21 Stunden.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 26.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 200 Quadrate kamen 509 Stäbchen
„ 2: „ 140 „ „ 315 „
Resultat: „ 340 „ „ 824 „
„ 1 „ „ 2,45 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,45.4 = 9,8 Millionen Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 9,8.26 = 254,8 Mill. Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 91 728 Millionen Stäbchen
Bei Berücksichtigung der Sporangiengröße = 4586 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche a und b:

Nach 21 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 4586 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 1,635 Proz. Harnstoff = 81,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Aus 10 Millionen Sporen waren nach 21 Stunden gebildet nahezu 4600 Millionen Stäbchen und gespalten über 1,6 Proz. Harnstoff = rund 82 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, in weiteren Versuchen waren nach 22 und 23 Stunden über 1,7 Proz. Harnstoff = 86 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge gespalten.

5. Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula (Originalstamm I von Löhnis).

I. Versuchsreihe und II. Versuchsreihe.

Bestimmung der Harnstoffspaltungs- und Vermehrungsgröße.

Die Zahl der zur Impfung benutzten Sporen wie der nach einer bestimmten Zeit daraus entstandenen Stäbchen wurde genau festgestellt; in der I. Versuchsreihe wurde der Zählung der Stäbchen die Septenbildung zugrunde gelegt; die nicht septierten Fäden wurden als 1 Stäbchen gezählt; in der II. Versuchsreihe wurde bei Zählung der Stäbchen die Sporangiengröße berücksichtigt.

Versuchsmaterial: Ausgereiftes Sporenmaterial der 21. auf Ammon-Agar gezüchteten Kulturgeneration.

I. Versuchsreihe.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung 1
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 5.

Zählung der Mischung 2:

Zählung 1: Auf 120 Quadrate kamen 34 Sporen
„ 2: „ 60 „ „ 18 „
Resultat: „ 180 „ „ 52 „
„ 1 „ „ 0,29 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,29.4 = 1,16 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 1,16.5 = 5,8 Millionen Sporen

Harnstoffspaltung und Keimzählung.

Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.

Versuchstemperatur:

Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 5,8 Millionen Sporen.

1. Versuch. Versuchsdauer 23 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit,

26 ccm Flüssigkeit, wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,2 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4
Nach 23 Stunden waren demnach gebunden . . . . 0,6 ccm n/H_2SO_4 = 0,018 g Harnstoff = 0,09 Proz. Harnstoff = 4,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 8.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 60 Quadrate kamen 8 Stäbchen
„ 2: „ 40 „ „ 6 „
Resultat: „ 100 „ „ 14 „
„ 1 „ „ 0,14 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,14.4 = 0,56 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 0,56.8 = 4,48 Mill. Stäbchen
„ 26 ccm „ „ A „ 116 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus 5,8 Millionen Sporen 116 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,09 Proz. Harnstoff = 4,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

2. Versuch. Versuchsdauer 46¾ Stunden.
a) Harnstoffspaltung.
Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 15 ccm Säure
+ 1 ccm Impfmaterial
= 36 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 35 ccm Titrierflüssigkeit,

36 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 15 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 9,25 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 46¾ Stunden waren gebunden 5,55 ccm n/H_2SO_4 = 0,1665 g Harnstoff = 0,8325 Proz. Harnstoff = 41,6 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 15.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Auf 400 Quadrate kamen 104 Stäbchen
„ 2: „ 100 „ „ 25 „
Resultat: „ 500 „ „ 129 „
„ 1 „ „ 0,258 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 0,258.4 = 1,032 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 1,032.15 = 15,48 Mill. Stäbchen
„ 36 ccm „ „ A „ 557 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2 a und 2 b:

Nach 46¾ Stunden waren gebildet aus 5,8 Millionen Sporen 557 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon rund 0,8 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Gesamtresultat:

Nach 23 Stunden waren gebildet aus rund 6 Millionen Sporen 116 Millionen Stäbchen und gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,09 Proz. Harnstoff = 4,5 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 46¾ Stunden nahezu 600 Millionen Stäbchen und Fäden und gespalten über 0,8 Proz. Harnstoff = 42 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Die niedrige Zahl der Stäbchen ist auf die Art der Berechnung in dieser Versuchsreihe zurückzuführen: Wie schon erwähnt, wurden die reichlich vorkommenden Fäden nur als 1 Stäbchen gerechnet, wenn keine Septierung (trotz Färbung) zu sehen war (Fig. 5 p. 337).

II. Versuchsreihe.

Sporenzählung.

Mischung 2: 1 ccm der Sporenmischung (1) 1 = 5 verdünnt (wie die Mischung 2 der ersten Versuchsreihe).

Zählung der Mischung:
Zählung: Auf 100 Quadrate kamen 50 Sporen
Resultat: „ 1 „ „ 0,5 „
„ 1 ccm der Mischung 2 kamen 0,5.4 = 2 Millionen Sporen
„ 1 ccm „ „ 1 „ 2,5 = 10 „ „

Harnstoffspaltung und Keimzählung.
Kulturflüssigkeit: 20 ccm Bouillon + 1 Proz. Pepton + 2 Proz. Harnstoff.
Versuchstemperatur: 28° C.
Impfmenge: 1 ccm der Sporenmischung 1 = 10 Millionen Sporen.

1. Versuch. Versuchsdauer 30 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 5 ccm Säure
= 26 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 25 ccm Titrierflüssigkeit

26 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 5 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 3,9 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 30 Stunden waren also gebunden 0,9 ccm n/H_2SO_4 = 0,027 g Harnstoff = 0,135 Proz. Harnstoff = 6,75 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

b) Keimzählung.

Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.

Zählung der Mischung B:
Zählung: Auf 400 Quadrate kamen 586 Stäbchen
Resultat: „ 1 „ „ 1,465 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 1,465.4 = 5,86 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ A „ 5,86.14 = 84,04 Mill. Stäbchen
„ 26 ccm „ „ A „ 2133 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 1 a und 1 b:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 2133 Millionen Stäbchen, gespalten 0,135 Proz. Harnstoff = 6,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

2. Versuch. Versuchsdauer 44 Stunden.

a) Harnstoffspaltung.

Die Mischung A, bestehend aus 20 ccm Kulturflüssigkeit
+ 1 ccm Impfmaterial
+ 7 ccm Säure
= 28 ccm Flüssigkeit
— 1 ccm zur Zählung
= 27 ccm Titrierflüssigkeit,

28 ccm Flüssigkeit wurde nach kräftigem Schütteln und nach Entnahme von 1 ccm, der zur Zählung Verwendung fand, titriert.

Im Überschuß waren vorgelegt . . . 7 ccm n/H_2SO_4
Zur Neutralisation waren nötig . . . 4,1 ccm n/KOH
20 ccm sterilisierte 2-proz. Harnstoffbouillon erfordern . . . . 0,2 ccm n/H_2SO_4

Nach 44 Stunden waren also gebunden 2,7 ccm n/H_2SO_4 = 0,081 g Harnstoff = 0,405 Proz. Harnstoff = 20,25 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge.

Kurventafel No. 2.

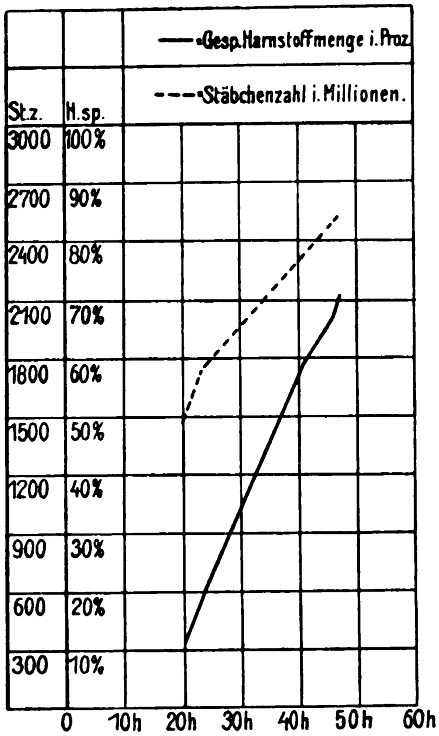


Fig. 1. Stamm A.
I. Zählversuchsreihe.

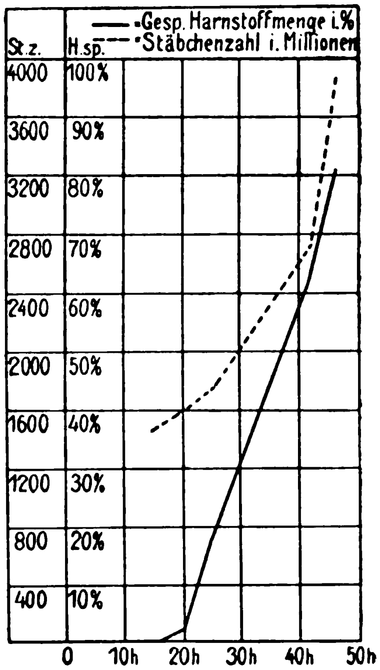


Fig. 2. Stamm A.
II. Zählversuchsreihe.

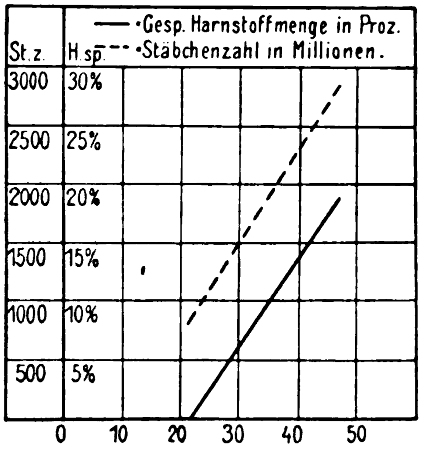


Fig. 7. Stamm C.

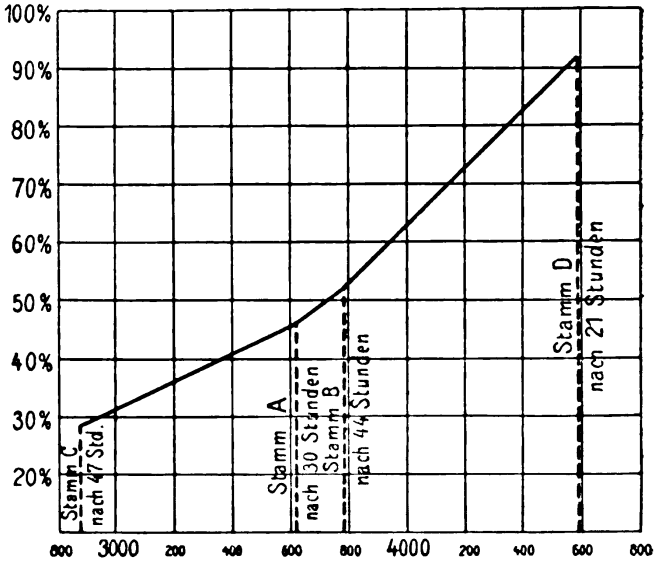
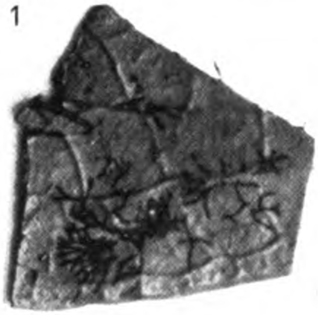
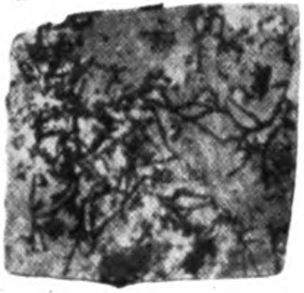


Fig. 8. Verhältnis der Harnstoffspaltungsgröße zur Vermehrungsgröße.

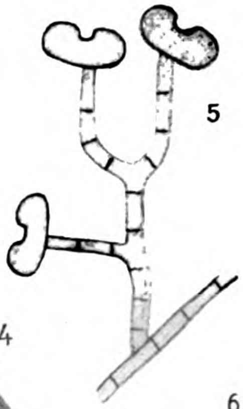
1



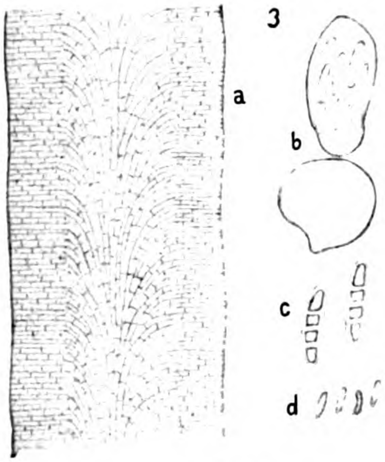
2



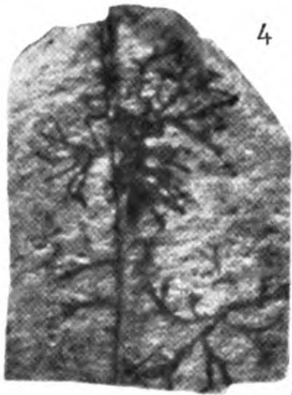
5



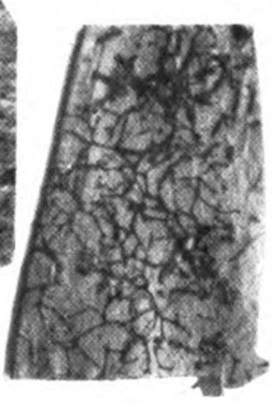
3



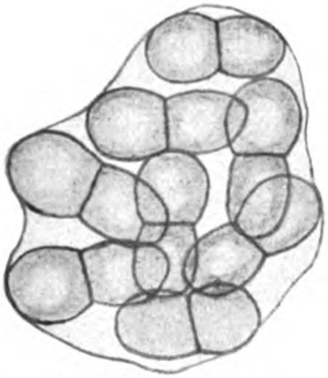
4

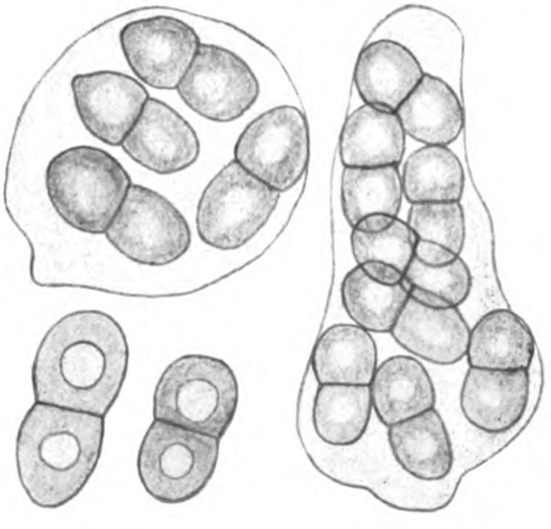


6

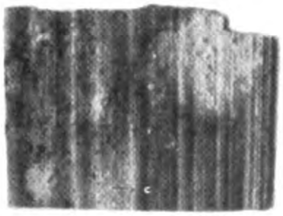


7





8



Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Kurventafel No. 2.

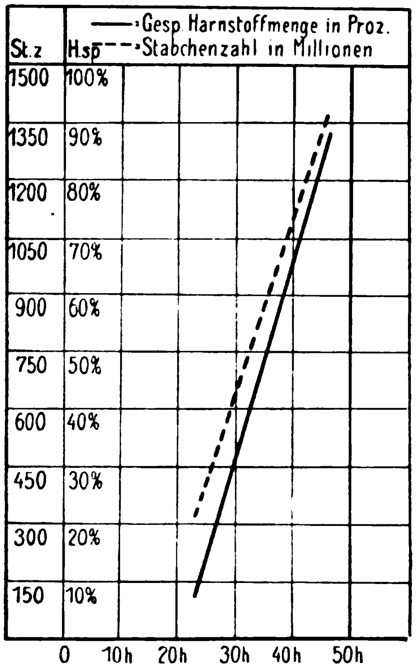


Fig. 3. Stamm B.
I. Zählversuchsreihe.

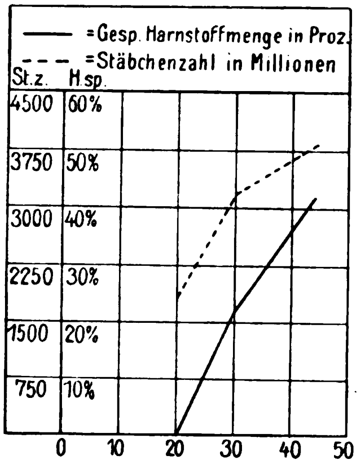


Fig. 4. Stamm B.
II. Zählversuchsreihe.

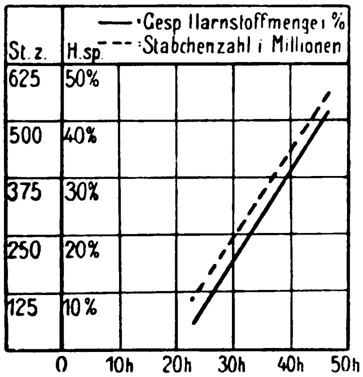


Fig. 5. B. Freudenreichii.
I. Zählversuchsreihe.

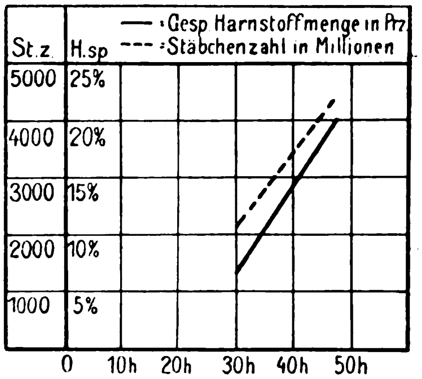


Fig. 6. B. Freudenreichii.
II. Zählversuchsreihe.

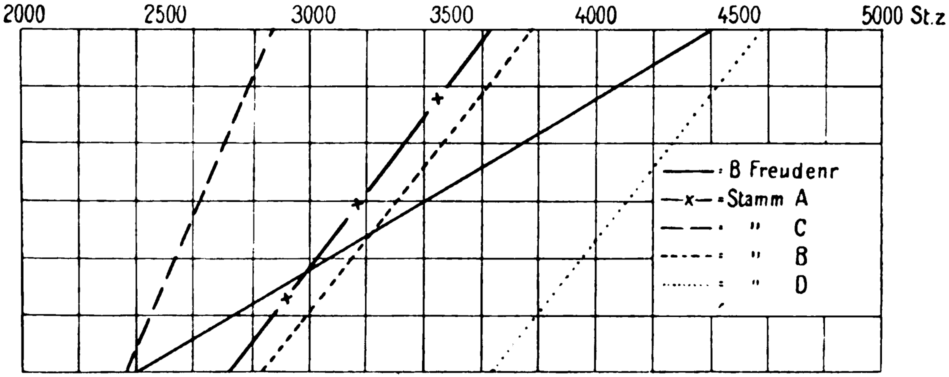


Fig. 9. Verhältnis der Harnstoffspaltungsgröße zur Vermehrungsgröße.

b) Keimzählung.
Mischung B: 1 ccm der Mischung A
+ Zählzusatz
Verdünnung 1 = 14.
Zählung der Mischung B:
Zählung 1: Aut 160 Quadrate kamen 474 Stäbchen
„ 2: „ 100 „ „ 252 „
Resultat: „ 260 „ „ 726 „
„ 1 „ „ 2,8 „
„ 1 ccm der Mischung B kamen 2,8.4 = 11,2 Mill. Stäbchen
„ 1 ccm „ „ A „ 14.11,2 = 156,8 Mill. Stäbchen
„ 27 ccm „ „ A „ 4234 Millionen Stäbchen.

Endresultat der Versuche 2a und 2b:

Nach 44 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen 4234 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,405 Proz. Harnstoff = 20,25 Proz. der zugesetzten Menge Harnstoff.

Tabelle XV.

Versuchsmaterial	Sporenimpfmenge in Mill.	Versuchsdauer in Std.	Gespalten von 2% Harnstoff %	Stäbchenzahl in Mill.	Art der Zählung
I. Versuchsreihe.					
B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	5,8	23	4,5	116	einzellige u. fäd. Oidien
B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	5,8	46¾	42	556	„
I. Versuchsreihe.					
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	23	7,5	255	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	46	88,5	1426	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	46½	81	1375	„
II. Versuchsreihe.					
B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	10	30	6,75	2133	ein-lange Oidien
B. Freudenr. 21 Kg. auf Ammon-Agar	10	44	20,25	4234	„
St. A. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	20	—	2037	„
St. A. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	30	36	3618	„
II. Versuchsreihe.					
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	20	—	1834	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	30	21	3165	„
St. B. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	44	42	3782	„
St. C. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	22	—	864	„
St. C. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	47	18,75	2877	„
St. D. 21Kg. auf Ammon-Agar	10	21	81,75	4586	„

Gesamtresultat:

Nach 30 Stunden waren gebildet aus 10 Millionen Sporen über 2100 Millionen Stäbchen, gespalten in 2 Proz. Harnstoffbouillon 0,135 Proz. Harnstoff = 6,75 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge, nach 44 Stunden waren gebildet rund 42 Millionen Stäbchen, gespalten 0,4 Proz. Harnstoff = 20 Proz. der zugesetzten Harnstoffmenge. (Fig. 6 p. 337.)

Resultat der vergleichenden Untersuchung der Harnstoffspaltung.

Wie ich schon bei der Methode der Bakterienzählung und bei den einzelnen Versuchen erwähnte, ging ich bei den vergleichenden Untersuchungen der Harnstoffspaltung bei den verschiedenen Stämmen von jeweils 10 Millionen Sporen der verschiedenen Stämme aus, die unter möglichst gleichen Bedingungen herangezüchtet worden waren.

Das Sporenmaterial wurde in 20 ccm sterile Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff eingeimpft, die Kulturen bei 28° C hingestellt und nach bestimmten Zeiten (innerhalb 20—50 Stunden) die Vermehrungs- und Spaltungsgröße bestimmt. Der Zählung der Oidien wurde möglichst die durchschnittliche Sporangiengröße zugrunde gelegt. Dabei stellte sich heraus, daß die Größe der Harnstoffspaltung annähernd der gefundenen Oidienzahl proportional ist; dieses gilt für die Stämme A—D. Aus den Tabellen geht das nahe Verhältnis der Harnstoffspaltungsgröße zur Vermehrungsgröße deutlich hervor (siehe auch Fig. 8 p. 336, Fig. 9 p. 337).

Stäbchenzahl in Millionen	Gespaltene Harnstoffmenge in g
2076	0,0
2877	0,075
3165	0,084
3618	0,144
3782	0,168
4586	0,327

Die Vermehrungs- und Spaltungsgröße in 20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon ist also folgende:

Bei rund 2100 Millionen Stäbchen sind gespalten rund 0 Proz.
„ „ 2900 „ „ „ „ „ 19 „
„ „ 3200 „ „ „ „ „ 21 „
„ „ 3600 „ „ „ „ „ 36 „
„ „ 3800 „ „ „ „ „ 42 „
„ „ 4600 „ „ „ „ „ 82 „
des zugesetzten Harnstoffs.

Daraus geht hervor, daß die Harnstoffspaltung erst nachweisbar wird, wenn mehr als 2000 Millionen Stäbchen in 20 ccm Bouillon gebildet sind. Nehmen wir an, daß bei 2500 Millionen Stäbchen eben Ammoniak nachzuweisen ist, so finden wir für weitere je 500 Millionen Stäbchen etwa 20 Proz. des zugesetzten Harnstoffs zersetzt: bei 3000 = 20 Proz., bei 3500 = 40 Proz., bei 4500 = 80 Proz. des zugesetzten Harnstoffs.

Ein abweichendes Resultat ergaben die Versuche mit Bac. Freudenreichii, Stamm I Löhnis.

Hier entsprachen

Stäbchenzahl in Millionen	Gespaltene Harnstoffmenge in g
2133	0,027
4234	0,081

Die Vermehrungs- und Spaltungsgröße in 20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon beträgt also:

Bei rund 2100 Millionen Stäbchen sind gespalten rund 7 Proz., bei rund 4400 Millionen rund 20 Proz. des zugesetzten Harnstoffs.

Berücksichtigt man nun aber die durchschnittlichen Größen der Zellen der verschiedenen Stämme und berechnet daraus ihre Oberfläche, so erhält man Resultate, die auf eine Abhängigkeit der Harnstoffspaltungsgröße von der Oberflächengröße der spaltenden Zellen schließen lassen:

Die durchschnittliche Größe der Zellen von Bac. Freudenreichii, St. I, Löhnis beträgt 2 μ in der Länge, 0,6 μ in der Breite, von Bac. probatus, St. B. (Urob. Leubei) beträgt 3 μ in der Länge, 0,8 μ in der Breite.

Nach der Oberflächenformel $2\pi r^2 + 2 r \pi . H$ berechnet sich die Oberfläche von Bac. Freudenreichii mit 4,336 μ^2, die Oberfläche von Bac. probatus, St. B. mit 8,545 μ^2.

Wir vergleichen nun die Abhängigkeit der Harnstoffspaltungsgröße von der Zellzahl und Zelloberfläche bei Bac. Freudenreichii mit der bei Bac. probatus, St. B. beobachteten oder wir vergleichen nur die Zahlen, so finden wir (siehe die Tabelle) z. B. nach 44 Stunden, daß rund 4400 Millionen Stäbchen von Bac. Freudenreichii mit einer Oberfläche von über 4 μ^2 pro Zelle rund 20 Proz. des zugesetzten Harnstoffs gespalten haben, während rund 3800 Millionen Stäbchen von Bac. probatus, St. B. mit einer Oberfläche von über 8 μ^2 42 Proz. des zugesetzten Harnstoffs gespalten haben. Wir sehen, daß bei nicht zu großem Zahlenunterschied, aber doppelt großer Oberfläche der Zellen in dem einen Falle hier auch die doppelte Menge Harnstoff gespalten wird. Zum Nachweis der hier vermutungsweise ausgesprochenen Gesetzmäßigkeit müßten allerdings exaktere Versuche möglichst mit genauem Messen der Zellängen vorgenommen werden.

Berechnung der Stundengärleistung von Bac. Freudenreichii, St. I, Löhnis und Bac. probatus, St. B. (Urobac. Leubei).

Die Berechnung der Stundengärleistung, d. h. der Menge eines Stoffwechselproduktes oder Spaltungsproduktes, das innerhalb 1 Stunde von einer durchschnittlichen Einzelzelle produziert oder abgespalten wird, wurde nach der Rahnschen Formel (Ableitung, siehe O. Rahn 1912) ausgeführt.

In der Formel: $x = \frac{H . \log. \frac{b}{a}}{t (b - a) \log. 2}$ ist

x = Stundengärleistung,
H = die Menge des gespaltenen Harnstoffs,
a = die Zellenzahl am Anfang des Versuches,
b = die Zellenzahl nach der Zeit t,
t = die Versuchsdauer.

1. Bacillus Freudenreichii, Stamm I, Löhnis.

Aus 10 Millionen in 2-proz. Harnstoffbouillon eingeimpften Sporen waren nach 30 Stunden gebildet: 2133 Millionen Stäbchen, gespalten: 0,027 g Harnstoff; nach weiteren 14 Stunden, also insgesamt 44 Stunden Versuchsdauer: 4390 Millionen Stäbchen, gespalten: 0,081 g Harnstoff.

Demnach war die gespaltene Harnstoffmenge H = 0,054 g Harnstoff, a = 2133 Millionen Stäbchen, b = 4390 Millionen Stäbchen, t = 14 Stunden und $x = 1{,}78 . 10^{-12}$g Harnstoff.

2. Bacillus probatus, Stamm B. (Urobac. Leubei).

Aus 10 Millionen in 2-proz. Harnstoffbouillon eingeimpften Sporen waren nach 30 Stunden gebildet: 3165 Millionen Stäbchen, gespalten: 0,084 g Harnstoff; nach weiteren 14 Stunden, also insgesamt 44 Stunden Versuchsdauer, waren gebildet: 3782 Millionen und 0,168 g Harnstoff gespalten.

Demnach war $H = 0{,}084$ g Harnstoff, $a = 3165$ Millionen Stäbchen, $b = 3782$ Millionen Stäbchen, $t = 14$ Stunden und $x = 2{,}5 \cdot 10^{-12}$g Harnstoff.

Berechnungen aus der Menge des Sporenimpfmaterials und der nach bestimmten Zeiten daraus enstandenen Stäbchenzahl ohne oder mit Berücksichtigung der mittleren Keimungszeit von 15 Stunden, gibt anscheinend keine genauen Resultate, weshalb ich von der Ausführung dieser Berechnungsversuche absehe.

Will man also die Stundengärleistung ermitteln, so ist es bei Sporenimpfung nicht so wichtig, die Anzahl der eingeimpften Sporen zu kennen, als vielmehr in mindestens zwei Zeitabständen die Stäbchenzahl und in unserem Falle gleichzeitig auch die Menge des gespaltenen Harnstoffes zu ermitteln; dabei ist zu berücksichtigen, daß die Zeitabstände so gewählt werden müssen, daß in dem ersten Falle möglichst alle Sporen gekeimt sind und schon Harnstoff gespalten ist, in dem zweiten Falle noch ein Wachstum stattfinden kann und noch unzersetzter Harnstoff vorhanden ist. In unseren Versuchen wählten wir (siehe oben) die Zeitabstände 30 und 44 Stunden, bei denen meist die erwähnten Voraussetzungen erfüllt waren.

Kapitel 11.

Kritische Literaturübersicht über harnstoffspaltende Bakterien.

In der Literatur sind eine große Zahl von Bakterienspezies aufgeführt, denen das Vermögen der Harnstoffspaltung zukommen soll. Die Angaben sind jedoch so unvollkommene, die Beschreibungen nach dem jetzigen Stand unserer Kenntnisse so unzureichende, daß es tunlich schien, in ähnlicher Weise wie Bredemann (1909) vorzugehen, d. h. die Beschreibungen kritisch auf ihren Wert als Speziesdiagnose zu prüfen und die als harnstoffspaltend beschriebenen Formen unter Berücksichtigung der bei unserer Spezies beobachteten Variationsbreite der Eigenschaften zu gruppieren in

I. bestimmt zu unserer Spezies Bac. probatus gehörende Formen (hierhin jene, die ich selbst in Kultur hatte und die sich beim Vergleich als Bac. probatus A. M. et Viehoever erwiesen);

II. wahrscheinlich zu unserer Spezies Bac. probatus zu rechnende Formen (hierhin Formen mit wenigstens einer Anzahl von diagnostischen, für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechenden Merkmalen und ohne ein wesentlich davon abweichendes Merkmal);

III. möglicherweise zu unserer Spezies Bac. probatus gehörende Formen (hierin solche, die Merkmale aufweisen, welche für und welche gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen);

IV. wahrscheinlich nicht zu unserer Spezies gehörende Formen (solche, die Merkmale aufweisen, welche für und gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen, die aber wegen mangelhafter Charakterisierung zu streichen sind);

V. sicher nicht zu unserer Spezies gehörende Formen (solche, die zwar

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

das Harnstoffspaltungsvermögen mit unserer Spezies gemeinsam haben, sonst aber abweichende Merkmale aufweisen).

I. Nach meinen Untersuchungen bestimmt zur Spezies Bac. probatus zu rechnende Formen:

1. Urobacillus pasteurii (Miquel) Beijerinck.
2. „ leubei Beijerinck.
3. Bacillus Pasteurii (Miquel) Migula, Stamm B_3 Löhnis.

II. Wahrscheinlich zu unserer Spezies Bac. probatus gehörende Formen (hierhin also Formen mit wenigstens einer Anzahl von diagnostischen, für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechenden Merkmalen und ohne ein wesentlich davon abweichendes Merkmal); die Spezies sind wegen nicht genügender Beschreibung, zu weitgehender Berücksichtigung der Harnstoffspaltung und wegen des Ausgestorbenseins der Originalkulturen zu streichen.

1. Bacillus ureae α = Urobacillus Madoxii Miquel,
2. „ „ γ = „ Freudenreichii Miquel,
3. „ „ β = „ Duclauxii Miquel,
4. „ „ ϱ = „ Pasteurii Miquel,
5. „ „ δ = „ Miquel,
6. „ „ ε = „ Miquel,
7. „ „ Stamm II Burri,
8. „ „ „ III Burri,
9. Bacterium ureae = Bacillus ureae (Leube) Günther.
10. Die sporenbildenden harnstoffspaltenden Bakterien von Rochaix et Dufourt.

Die Miquelschen Spezies (1—6).

Miquel berücksichtigte bei der Beschreibung seiner Spezies in erster Linie zu ihrer Unterscheidung die Menge Harnstoff, die von den betreffenden Bakterien in einer gewissen Zeit gespalten wurde. Er stellte sogar nach seinen Resultaten folgende Bestimmungstabelle für die Harnstoffbakterien auf, er unterschied (siehe auch Koch 1893. p. 287):

a) Arten, die mehr als 0,1 Proz. Harnstoff pro Stunde zersetzen:
Urobacillus Pasteurii (Miquel) zersetzt 0,3 Proz. Harnstoff pro Stunde,
„ Duclauxii (Miquel) zersetzt 0,15 Proz. Harnstoff pro Stunde.

b) Arten, die weniger als 0,1 Proz. Harnstoff pro Stunde zersetzen, aber wenigstens 0,5 Proz. Harnstoff pro Tag:
Urobacillus Madoxii zersetzt 0,8 Proz. Harnstoff pro Tag,
„ Freudenreichii zersetzt 0,6 Proz. Harnstoff pro Tag,
„ δ zersetzt 0,5 Proz. Harnstoff pro Tag.

c) Arten, die weniger als 0,5 Proz. Harnstoff zersetzen, langsam und unvollständig arbeiten:
Urobacillus ε zersetzt 0,05 Proz. Harnstoff pro Tag.

So hat Miquel wesentlich auf Grund ihres verschiedenen Harnstoffspaltungsvermögens gegen 60 Arten sporenbildende und nichtsporenbildende, stäbchen- und kokkenförmige harnstoffspaltende Bakterien angenommen, aber in seinem Buche (1898) nur einen Teil näher beschrieben. Das Vermögen der Harnstoffspaltung hielt er für eine ganz konstante, den Harnstoffbakterien eigentümliche Eigenschaft, die nur bei den verschiedenen Arten variiere. Er sagt (1898. p. 21): „la faculté de transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque est d'une puissance variable, suivant les espéces considerées mais elle parait constante dans les conditions identiques d'expérimentation pour les microbes bien isolés et cultivés à l'état de pureté; c'est le caractère qui à mon sens, doit être mis au prémier rang . . . . ."

Miquel weist hier auf die Notwendigkeit gleicher Kulturbedingungen beim Studium der Harnstoffspaltung der verschiedenen Arten hin.

Nach meinen Erfahrungen (siehe p. 98) kommen nun außer der Konstanz der Kulturverhältnisse, deren Innehaltung aus den Miquelschen Versuchen nicht immer klar zu ersehen sind, auch die Impfverhältnisse für die Größe der Harnstoffspaltung in Betracht. Als wichtigstes Resultat stellte sich aber bei meinen Versuchen heraus, daß die Größe der Harnstoffspaltung im wesentlichen abhängig ist von der Größe der Vermehrung.

Aus den Miquelschen Versuchen entnehme ich, daß er nicht von einheitlichem Impfmaterial ausgegangen ist; meist fehlen nähere Angaben über den Entwicklungszustand der eingeimpften Bakterien, zuweilen impfte er mit vergorener Harnstoffbouillon und zwar mit einigen Tropfen. Die Menge des Impfmaterials stellte er anscheinend in keinem Falle fest; in zwei Fällen ermittelte er das Gewicht der Bakterienmasse; die Vermehrungsgröße, d. h. die nach einer bestimmten Zeit gebildete Stäbchenzahl wurde nicht ermittelt.

Das Resultat der Spaltungsgröße ermittelte er in der Weise, daß er von Beginn der Spaltung an, den weiteren Verlauf der Harnstoffspaltung pro Stunde oder Tag verfolgte und das Resultat als die spezifische Spaltungskraft der betreffenden Bakterien ansah.

Da nun aber ein durch irgendwelcheUmstände geschwächter oder andererseits an Harnstoff besonders angepaßter Stamm eine andere Vermehrungsgröße und demzufolge auch eine andere Spaltungsgröße aufweisen muß, so ist daraus zu ersehen, daß die Feststellung der Spaltungsgröße allein kein differentialdiagnostisches Merkmal sein kann; sie wird erst brauchbar zur Speziesdiagnose, wenn bei Innehaltung einer bestimmten Vorbehandlung gleichzeitig die Vermehrungsgröße zahlenmäßig ermittelt wird und damit das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltungsgröße festgelegt wird.

Miquel hat nun aber, wie schon gesagt, nur die Spaltungsgröße bestimmt, nicht die Vermehrungsgröße; wir müssen deshalb seine diesbezüglichen Angaben als speziesdiagnostisch nicht verwertbare Merkmale bezeichnen, die darauf gegründeten Spezies als nicht mehr wieder zu erkennende ganz fallen lassen.

Morphologische Merkmale.

Bezüglich der Größe und Form seiner sporenbildenden Arten betont Miquel die große Ähnlichkeit aller bis vielleicht auf „Urobacillus Duclauxii"; er sagt von ihm (1898. p. 77): „C'est le seul ferment de l'urégé dont il me semble possible d'affirmer l'individualité au moyen de l'examen microscopique direct."

Die wenigen Angaben über Größe und Form der Sporen und Stäbchen sprechen, zumal bei Berücksichtigung der Variation, für die Zugehörigkeit der sporenbildenden Miquelschen Spezies, auch des „Urobacillus Duclauxii" zu unserer Spezies Bac. probatus. Für „Urobacillus Madoxii" betont Miquel das charakteristische Vorkommen von hefeähnlichen Involutionsformen; Involutionsformen ähnlicher Gestalt habe ich in allen Kulturen zuweilen beobachten können, besonders aber in den harnstoffhaltigen; auch Péja et Raja (1906, p. 60) haben auf Zusatz von Harnstoff zu Nährböden ganz abweichende Formen bei den verschiedensten Bakterien erhalten können, eine Beobachtung, auf die ich hier hinweisen möchte.

Beweglichkeit: Die Stäbchen von „Urobacillus δ und ε zeigten keine Bewegung, aber Neigung zur Fadenbildung, waren also zweifellos geschwächt; das Fehlen der Bewegung ist ja kein speziestrennendes Merkmal (siehe auch Ellis), zumal hier bei harnstoffspaltenden Bakterien, wo durch die Kultur in stark alkalischen Nährböden das Bewegungsvermögen überhaupt sehr geschwächt oder ganz aufgehoben werden kann.

Kulturelle Merkmale:

Das Wachstum auf schwach harnstoffhaltigen Nährböden war verhältnismäßig gut, auf harnstoffreien Nährböden fast durchweg sehr schlecht; da, wo besseres Wachstum beobachtet wurde, wie z. B. bei Urob. δ, ε und Freudenreichii fehlen, genauere Angaben über die Alkalität der benutzten Nährböden. Im Hinblick hierauf, sowie in Berücksichtigung der Tatsache, daß Angaben über die Vorkultur seiner Spezies überhaupt fehlen, sprechen Miquels Beobachtungen nicht gegen unsere Annahme der Zugehörigkeit seiner Spezies zu unserer.

Kardinalpunkte der Temperatur und Sauerstoffspannung.

Maximum der Temperatur für Wachstum.

Miquel gibt an, daß von seinen Spezies nur Urob. Madoxii, Duclauxii und Pasteurii bei 40° zu kultivieren seien, nicht aber Urob. δ, ε und Freudenreichii (Miquel). Da aber nähere Angaben über Kultur und Vorkultur, wie vor allem die über das tatsächliche Maximum der Temperatur für das Wachstum seiner letzten drei Formen fehlen, so ist auch das Ausbleiben ihres Wachstums bei 40° nicht als speziestrennendes Merkmal anzusehen.

Minimum der Sauerstoffspannung für das Wachstum.

Die Bakterien konnten in sauerstoffreiem Raume nicht wachsen, kamen aber mit wenig Sauerstoff aus, eine Beobachtung, die ja auch für meine Spezies zutrifft.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen hohe Temperatur (feuchte Wärme).

Nach Miquel (1904. p. 87—90) können Sporen von

Urob.	Pasteurii (Miquel)	eine	Wärme	von	87—90°	2	Stunden	aushalten
„	Duclauxii	„	„	„	95°	2	„	„
„	Freudenreichii	„	„	„	94°	2	„	„
„	Madoxii	„	„	„	94°	2	„	„
„	ureae δ	„	„	„	90°	2	„	„
„	„ ε	„	„	„	90°	2	„	„

Wenn auch die Resultate gut untereinander übereinstimmen, so ist doch die Tötungszeit der Sporen aus ihnen nicht zu ersehen, die Angaben haben also nur einen bedingten Wert für die Speziesdiagnose; sie sprechen aber weder für eine Verschiedenheit der Spezies untereinander, noch von meiner Spezies.

Giftkonzentration für Wachstum und Gärung.

Miquel ermittelte zur weiteren Kennzeichnung seiner Spezies auch die Giftkonzentration

1. für Wachstum, indem er dem Nährboden eine bestimmte Menge Silbernitrat, Sublimat, Kupfersulfat, Karbolsäure oder Borsäure zusetzte und dann ermittelte, bei welcher Konzentration kein Wachstum mehr stattfand;

2. für Gärung, indem er der geimpften Kulturbouillon Giftlösungen zusetzte und die Konzentration feststellte, bei der eine Gärung vollständig unterdrückt wurde.

Die etwas voneinander abweichenden Resultate sind jedoch für die Speziesdiagnose nicht zu gebrauchen, da, so weit ich aus seinen Angaben (1904. p. 79) schließen kann, die Kulturbedingungen und Impfmengen keine gleichen in den verschiedenen Versuchen waren, vor allem aber weil die Entwicklungsstadien nicht einheitlich und nicht gleich gewesen zu sein scheinen: Sporen enthaltende Nährflüssigkeiten erfordern natürlich zur Hemmung oder Abtötung eine weit größere Konzentration der Giftlösung als sporenfreie, oidienhaltige Nährmedien; auf diese Tatsache ist, wie ich vermute, auch die Verschiedenheit in den Resultaten der Miquelschen Versuche zurückzuführen.

Gelatineverflüssigungsvermögen.

Auf Harnstoffgelatine beobachtete Miquel gewöhnlich keine Verflüssigung; das Schleimigwerden der Gelatine nach 40—50-tägiger Kultur z. B. von Urob. Duclauxii führt er auf den Einfluß des freigemachten Ammoniaks und nicht auf die unmittelbare Tätigkeit der Bakterien zurück. Bei Kultur von Urob. Freudenreichii (Miquel) auf Fleischgelatine zeigte diese nach 10 Tagen einen Verflüssigungstrichter und war nach 4 Wochen gänzlich verflüssigt. Das Gelatineverflüssigungsvermögen kann bekanntermaßen allein als speziesdiagnostisches, trennendes Merkmal nicht herangezogen werden, da das Eintreten oder Ausbleiben der Gelatineverflüssigung von sehr vielen, meist nicht berücksichtigten, zum Teil wohl auch noch nicht bekannten Faktoren abhängig ist. Es liegt also auch hier kein Grund vor, die verflüssigende Miquelsche Spezies abzutrennen als besondere Spezies, zumal da ja meine Spezies nach längerer Kultur ebenfalls Verflüssigung zeigte.

Da wir nun bei unserem kritischen Vergleich kein wesentliches Merkmal haben feststellen können, das gegen die Zugehörigkeit der genannten Miquelschen Spezies zu unserer Spezies sprechen könnte, andererseits aber viele gemeinsame Merkmale fanden, so halten wir es für sehr wahrscheinlich, daß die genannten Spezies identisch sind mit unserer Spezies Bacillus probatus A. M. et V. Der endgültige Beweis konnte jedoch nicht geliefert werden, da die Miquelschen Spezies alle eingegangen sind und Kulturen zum Vergleich nicht mehr zu erhalten waren; wir müssen deshalb die Miquelschen Spezies als nicht mehr sicher wieder zu erkennende und auf unsichere Merkmale gegründete, ganz aus der Bakteriensystematik ausscheiden.

Bacillus ureae, Stamm II und III Burri, Herf., Stutz., (7—8).

Burri, Herfeldt und Stutzer (1894) sahen ebenfalls wie Miquel in der Feststellung der Harnstoffspaltungsgröße ein unerläßliches Merkmal zur Charakterisierung eines Harnstoffspalters. Die von ihnen isolierten sporenbildenden Formen spalteten, in 2 Proz. Harnstoffbouillon kultiviert, den ganzen Harnstoff in 12 Stunden, der Verlauf der Spaltung

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

war in beiden Fällen ein ähnlicher. Über den Wert dieser Feststellung für die Speziesdiagnose vergleiche das bei Besprechung der Miquelschen Spezies Gesagte.

Form und Lage der Spore, Größe der Oidien, Wachstum auf harnstofffreien und harnstoffhaltigen Nährböden, Bildung von Trimethylamin und Ausscheidung von Kristallen in harnstoffhaltigen Nährmedien entsprechen bei beiden Stämmen den für unsere Spezies festgelegten Beobachtungen. Daß bei Stamm II keine Bewegung der Stäbchen, bei Stamm III keine trommelschlägerförmig angeschwollenen Sporangien beobachtet wurden, daß nur bei der Kultur von Stamm III auf 2-proz. Harnstoffgelatine Verflüssigung stattfand, alles das spricht bei Berücksichtigung des oben Gesagten, sowie der Variation dieser Eigenschaften nicht gegen unsere Annahme, daß beide Stämme identisch sind mit unserer Spezies Bac. probatus. Da auch diese Stämme ausgestorben sind, so müssen sie als nicht mehr sicher wieder zu erkennende Arten ebenfalls fallen gelassen werden.

Bacterium ureae Leube = Bacillus ureae (Leube) Günther (9).

Leube und Graser (1885) isolierten aus gärendem Harn einen stäbchenförmigen Bacillus mit stark harnstoffspaltender Wirkung.

Tabelle von

No.	Form	Sporen	Beweglichkeit	Gramfärbung	Gelose	Gelatine	Serum coaguli	Kartoffel
1	Bacillus	+	+	—	dick weißlich	Verflüssigt	Verflüssigt	**Kultur braun mit gefalteter Oberfläche**
2	Bacillus	+	+	—	dick	Verflüssigt	Verflüssigt	**mit Mühe sichtbar**
3	Micrococcus	—	—	—	schnell gewachsen reichlich	Nicht verflüssigt	Nicht verflüssigt	**Kultur reichlich dick**
4	Micrococcus	—	—	—	Kultur dick weißlich	Nicht verflüssigt	Nicht verflüssigt	**Kultur dick weiß**
5	Bacillus	—	+	—	goldgelb	Verflüssigt	Nicht verflüssigt Kultur gelb	**Kultur dick gelb**
6	Bacillus	+	+	—	Kultur etwas dick	Nicht verflüssigt	Nicht verflüssigt	**Kultur kaum sichtbar**
7	Bacillus	—	+	—	Kultur dick weißlich	Verflüssigt	Verflüssigt	**Kultur kaum sichtbar**
8	Bacillus	+	+	—	Kultur weiß dick	Verflüssigt	Verflüssigt	**Kultur dick bräunlich**

Das Vermögen der Harnstoffspaltung, die Größe der Stäbchen, das schlechte Wachstum auf gewöhnlichen, harnstoffreien Nährböden, die Bildung von heringslakeähnlichem Geruch (Trimethylamin ?) sprechen für die Zugehörigkeit zu unserer Spezies, nicht dagegen spricht das Ausbleiben der Gelatineverflüssigung. Eine Angabe über das Vorkommen von Sporen fehlt, jedoch scheint Leube Sporangien gesehen zu haben. da er auf das Vorkommen von 3,5 μ langen Stäbchen mit deutlicher Einschnürung in der Mitte und Abrundung des anliegenden Endes hinweist.

Die sichere Entscheidung der Zugehörigkeit dieses Bacillus zu unserer Spezies ist jedoch wegen der unzureichenden Beschreibung und des Einganges der Kultur nicht möglich, weshalb wir auch diese Spezies fallen lassen.

Sporenbildende harnstoffspaltende Bakterien von Rochaix et Dufourt (10).

Rochaix und Dufourt haben aus Pferdemist sporenbildende und nichtsporenbildende Bakterien mit Harnstoffspaltungsvermögen isoliert. Sie stellten, wie aus der beigegebenen Tabelle ersichtlich ist, nur einige kulturelle und biochemische Eigenschaften fest. Eine Entscheidung über die Zugehörigkeit der sporenbildenden Formen zu unserer Spezies läßt sich wegen der ganz ungenügenden Beschreibung nicht fällen, zumal da die Kul-

Rochaix und Dufourt.

Bouillon	Milch	Tournesol	Neutralrot	Indol	Vergärung von		
					a) Laktose	b) Glykose	c) Harnstoff
trübe mit leichtem Schleier	Koaguliert	Keine Veränderung	Übergang ins Gelbe mit grünl. Fluoreszenz	—	—	—	+
trübe und schleimig auf der Oberfläche	Koaguliert	Übergang ins Rote	Übergang und Fluoreszenz	+	+	+	+
Gleichmäßige Trübung ohne Schleier	Nicht koaguliert	Stich ins Rote	Übergang und Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig ohne Schleier	Nicht koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig	Nicht koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig	Nicht koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung gleichmäßig	Koaguliert	Keine Veränderung	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+
Trübung und Schleier an der Oberfläche	Alkalibildung	Stich ins Blaue	Umschlag Fluoreszenz	+	—	—	+

turen, trotz meiner Bemühungen, nicht zu erhalten waren. Deshalb müssen auch diese Formen fernerhin unberücksichtigt bleiben.

III. Möglicherweise zu unserer Spezies gehörende Formen (hierhin solche, die Merkmale aufweisen, die für und die gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen; diese könnten bei weiteren Untersuchungen sehr vieler Stämme noch in die Variationsgrenzen der Spezies fallen).

1. Bacillus Freudenreichii (Miquel) Migula, Originalstamm Löhnis.

2. Bacillus Pasteurii (Miquel), Stamm A_{4a}, Migula, Originalstamm Löhnis.

Bacillus Freudenreichii (1), (Originalstamm Löhnis), Stamm I.

Wie aus den Resultaten unserer vergleichenden Versuche zu ersehen ist, stimmen viele Eigenschaften im wesentlichen mit den bei unserer Spezies beobachteten überein. Dagegen stimmt nicht die Größe der Sporen und Stäbchen, die wesentlich kleiner sind, ferner ist das Verhältnis der Stäbchenzahl zur Harnstoffspaltung, d. h. die Spaltungsgröße eines Oidiums eine andere als die bei unserer Spezies beobachtete. Wir müssen deshalb diese Spezies noch als eine besondere Spezies betrachten, vorbehaltlich einer Änderung dieser Annahme nach genauerer Untersuchung einer größeren Anzahl von Stämmen des Bac. probatus oder Freudenreichii.

Bacillus Pasteuri (2), (Stamm A_{4a}), Originalstamm (Löhnis).

Der Stamm verhielt sich ähnlich wie der Stamm I des Bac. Freudenreichii Löhnis, war jedoch so geschwächt und bildete so wenig Sporen, daß es nicht möglich war, die Variation der Sporengröße und von Sporen ausgehend die Vermehrungs- und Spaltungsgröße festzustellen. Wir müssen deshalb unentschieden lassen, ob der Stamm zu unserer Spezies oder zu Bac. Freudenreichii zu rechnen ist oder von beiden verschieden ist.

IV. Wahrscheinlich nicht zu unserer Spezies zu rechnende Formen (also solche, die Merkmale aufweisen, welche für und solche, welche gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies sprechen; Spezies, die wegen mangelhafter Charakterisierung ganz zu streichen sind).

1. Bacterium vernicosum (Zopf).

Der Bacillus wurde von Zopf (1892) aus Baumwollsaatmehlen, die angeblich schädlich waren für Tiere, isoliert.

Das Harnstoffspaltungsvermögen und das Wachstumsmaximum bei 45 bis 46° C sprechen für, das kulturelle Verhalten und die Bildung von Gas (CO_2) gegen die Zugehörigkeit zu unserer Spezies. Wegen der mangelhaften Beschreibung ist die Spezies ganz zu streichen.

V. Sicher nicht zu unserer Spezies gehörende Formen (hierhin stelle ich also alle die Formen, die zwar das Harnstoffspaltungsvermögen mit unserer Spezies gemein haben sollen, die aber sonst abweichende Merkmale aufweisen).

A. Stäbchenförmige Bakterien.

1. Mit Sporen:

Bacillus mycoides (siehe Löhnis 1905. p. 397. 1910. p. 460).

Bacillus megatherium (siehe Löhnis 1905. p. 397. 1910. p. 460).

Bacillus pumilus A. M. et Gottheil (Bierema 1909. p. 708. Löhnis 1910. p. 460).

2. Ohne Sporen:

Bacillus erythrogenes (Söhngen 1909, Löhnis 1905).

Bacillus Kirchneri, Löhnis (1905).

„ lipsiense Löhnis (1905).

„ putidum Löhnis (1905).

„ fluorescens liquefaciens (Warington 1888).

„ praepollens (Maassen 1899).

Urobacillus Jakschii (Söhngen 1909).

„ Miquelii (Beijerinck 1901), nach Beijerinck mit Bact. Zopfii und Bact. asteriodes phylogenetisch zu einer Gruppe gehörend.

Urobacillus Beijerinckii (Christensen 1910).

Bacterium vulgare = Bacillus vulgaris Macé, Migula = Bac. Proteus vulgaris Hauser = Proteus Hauseri = B. Proteus vulgaris Kruse = B. albus cadaveris Strecker und Straßmann = Bac. foetidus ozenae Hajek = Urobacillus liquefaciens septicus Krogius (Lehmann und Neumann 1907. p. 385).

Bacterium coli (Escherich, Lehmann und Neumann 1912).

Bacterium prodigiosum (Ehrenberg, Lehmann und Neumann 1912).

Bacterium Kiliense (Fischer et Breunig) Lehmann et Neumann 1912; mit Bacterium prodigiosum identisch oder nächstverwandte Art, nach Lehm. et Neum.

Bacterium indicum, mit Bact. prodigiosum nächstverwandt (Löhnis 1910, Lehm. et Neum. 1912).

B. Kokkenförmige Bakterien.

a) Sarzinen.

1. Mit Sporen:

Planosarcina ureae (Beijerinck) 1901.

Urosarcina dimorpha (Beijerinck) 1901; konnte weder von Beijerinck selbst, noch von Král erhalten werden.

2. Ohne Sporen:

Sarcina ventriculi (Leube 1885).

b) Kokken ohne Sporen.

Micrococcus ureae = Urococcus van Tieghemi = Torul. ammoniacale Pasteurii (Beij. 1901, Miquel 1904).

Micrococcus ureae liquefaciens Flügge = Micrococcus u. Staphylococcus pyogenes j. albus Rosenbach = Micrococcus pyogenes Migula = (?) Micrococcus candicans Flügge (Lehmann et Neumann 1907) = Staphylococcus ureae liquefaciens Burchard.

Micrococcus pyogenes *α* aureus (Lehmann et Neumann 1912).

Staphylococcus pyogenes aureus (Moll 1902. 2. p. 347).

Ganz unsicher ist die systematische Stellung des Urobacillus Schützenbergii I und II (Miquel 1904), des Urococcus

Dowdeswelli und der Urosarcina Hansenii (ebenda), sowie der zahlreichen Miquelschen Urococcus-Spezies, ferner die des Bac. ureae I Burri, Herfeldt und Stutzer, des Bact. ureae Leube, St. 4, der von Christensen isolierten Stämme a—e, wie schließlich die systematische Stellung der von Rochaix et Dufourt isolierten, nichtsporenbildenden, harnstoffspaltenden Bakterien (Tabelle p. 139).

Nach Löhnis (1910. p. 458—459) gehören in die Proteus-Gruppe sicher der Urobacillus Miquelii Beijerinck, vermutlich auch der Urobacillus Schützenbergii I Miquel, II Cambier, der Urobacillus Jakschii Söhngen und vielleicht auch das Bacterium ureae Leube; der Bac. ureae I Burri, Herf. u. St. besitzt nach Löhnis die Eigenschaften des Bact. vulgare var. Zopfii; der größte Teil der Urococcus-Spezies gehört nach Löhnis sehr wahrscheinlich zu Micrococcus pyogenes Rosenbach.

Kapitel 12.

Zusammenstellung der wichtigsten Merkmale der Spezies Bacillus probatus A. M. et Viehoever.

Morphologische Merkmale.

Nach Vorbehandlung und Weiterzucht auf:
1. ⅓ D-Agar + 0,2% Ammonkarbonat (Ammon-Agar),
2. ⅓ „ + 0,2% Harnstoff Harnstoff-Agar,
3. ⅓ „ + 2,0% „ „ „

Sporen:
Sporenform: kugelig, elliptisch, eiförmig, zylindrisch.
„ vorwiegend kugelig (Fig. 1—3).
Sporengröße auf Ammon-Agar (Originalstamm): 0,5—1 μ breit,
„ „ „ „ 0,6—1,2 μ lang,
„ „ „ „ 0,8—0,9 μ, kugelig, am häufigsten.
„ „ „ (Spezies): 0,5—1 μ breit,
„ „ „ „ 0,5—1,2 μ lang (siehe Variationskurve p. 353).

Die Sporenmembran zeigt ungefärbt keine Differenzierung in Exine und Intine; Methylenblau (1 + 10) färbt die Exine etwas dunkler blau als die Intine. Die Spore tritt nach der Ausreifung meist nicht aus dem Sporangium heraus, sondern bleibt zuweilen monatelang in dem zu einem Hemangium (Sporangienhälfte) umgestalteten Sporangium (Fig. 3,34—39). Die Keimung der Sporen erfolgt meist äquatorial (Fig. 6,52), zuweilen auch polar (Fig. 8).

Keimstäbchen. Die Keimstäbchen entstehen auf Ammon-Agar oder 0,2 Proz. Harnstoff-Agar bei 28° nach 5—6 Stunden und sind sofort beweglich (Fig. 8,52); die peritrich angeordneten Geißeln sind dünn ausgebildet und bis zu 10 Stück an den Keimstäbchen beobachtet worden. Die Keimstäbchen auf Ammon-Agar sind einstäbig, meist 1-lang und 0,4—0,6 μ breit (Fig. 52).

Oidien. Schwärmoidien sind in 15—20 Stunden alter, bei 28° gezüchteter Kultur auf Ammon-Agar reichlich anzutreffen; meist kommen 1—3-stäbige (Fig. 15—17) und 1 μ lange, etwa 0,8 μ breite Oidien vor. Auf alkalischer Nährgelatine wurden häufiger 2—3 μ lange, einzellige Stäbchen beobachtet; ihre Länge betrug 5—10 μ, die Breite 0,8—1,0 μ (Fig. 18—19).

Auf Kartoffel-Kreidekulturen fand ich vorwiegend 0,9 μ breite, ein- und mehrzellige Stäbchen (Fig. 20—22).

Die Oidien sind peritrich begeißelt; es wurden zahlreiche, bis 10 μ lange Geißeln beobachtet (Fig. 23, 53, 55—56, 58—59).

Sporangien. Nach 3—4 Tagen entstehen auf Ammon-Agar, der mit Sporenmaterial geimpft war und bei 28° C gezüchtet wurde, mehr oder weniger endständige Sporen in klostridien-, trommelschläger- oder spindelförmig angeschwollenen Sporangien (Fig. 24—33); es gelang unter Umständen, peritriche Geißeln an den in der Kultur zum Teil lebhaft beweglichen Sporangien nachzuweisen (Fig. 33, 57).

Hemangien. Die sporenfreie Sporangienhälfte verschwindet allmählich und aus dem zurückbleibenden Sporangienrest entstehen dann gewöhnlich die sogenannten Hemangien, die die Spore noch lange Zeit, mehrere Jahre sogar, umhüllen können; sie tragen ebenfalls Geißeln (Fig. 38—39).

Reservestoffe waren in den normalen Stäbchen und Sporangien nicht nachzuweisen; in Stäbchen, die durch ungünstige Kulturbedingungen geschwächt waren und körnige, stärker lichtbrechende Massen zeigten, konnte unter Umständen etwas Fett nachgewiesen werden.

Gramdauer. Die Gramdauer betrug für 3 Tage altes, vor der Sporenausbildung befindliches Ammon-Agarmaterial 20 Minuten.

Säurefestigkeit. Die Säure-Alkoholfestigkeit für Sporen fiel negativ aus; der Chitinnachweis dagegen positiv für alle Morphoden, ebenso der Geißelnachweis (mit Ausnahme der Sporen).

Plasmolyse. Plasmolyse wurde bei Stäbchen und Sporangien beobachtet (Fig. 63).

Kulturelle Merkmale.

Kein Wachstum auf neutralen Nährböden, schlechtes und unsicheres Wachstum auf D-Agar, Entwicklungsgang des Originalstammes auf Ammon-Agar: Nach 5 Stunden Keimung, nach 15 Stunden schwach getrübtes Kondenswasser und reichlich Schwärmoidien, nach 72 Stunden deutlich sichtbarer, etwas erhabener, weißlich- bis gelblichgrauer, opalisierend durchscheinender Belag und Sporangien mit junger Sporenanlage, nach 96 Stunden Sporangien mit zum Teil reifer Spore. Ähnlich ist der Entwicklungsgang auf 0,2 Proz. Harnstoffagar. Strichkultur auf Ammon-Agar: Nach 20 bis 24 Stunden dünner Belag, welcher wegen der Ähnlichkeit seiner Farbe mit der des Agars nur schwer sichtbar ist. Auf Kartoffel tritt schlechtes, unsicheres, auf Möhre gar kein Wachstum ein. Auf Kartoffel oder Möhre mit Kreidezusatz tritt meist kräftige Entwicklung ein.

Bei Verwendung von lackmusneutralem ⅓ D-Agar liegt das Maximum des Zusatzes für Sporenkeimung nach Zusatz von Natriumkarbonat (wasserfrei) bei etwas über 2 Proz., von Ammonkarbonat bei etwas über 22 Proz., von Harnstoff bei etwas über 30 Proz.; das Optimum des Zusatzes für Sporenkeimung, des Wachstums und der Sporenbildung liegt nach Zusatz von wasserfreiem Natriumkarbonat bei etwa 0,2 Proz., von Ammonkarbonat bei etwa 0,3 Proz., von Harnstoff unter 3 Proz.

In flüssigen neutralen Nährböden, z. B. Bouillon und den A. Meyerschen Nährlösungen findet kein Wachstum statt. Nach Zusatz von 0,1 Proz. Natriumkarbonat tritt nur in den peptonhaltigen Nährlösungen eine deutliche Entwicklung ein, nach Zusatz von Ammonkarbonat oder Harnstoff auch in asparaginhaltigen, sowie in fetthaltiger und fettfreier Milch.

Harnstoff kann nicht als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden, dagegen sehr wahrscheinlich in geringem Maße Ammonkarbonat. Als Stickstoffquelle sind Harnstoff und Ammonkarbonat bis zu gewissem Grade bei Gegenwart von Dextrose brauchbar, ebenso wahrscheinlich auch Biuret bei Gegenwart von Fleischextrakt. Nitrat und Nitrit waren nicht verwertbar, ebensowenig Glykokoll, Leuzin, Azetamid, Oxamid, Succinimid, Harnsäure, Urethan, Kreatin, Kreatinin, Guanidin, Thioharnstoff und Cyansäure.

Von den Kohlenstoffquellen wird Dextrose bevorzugt; in festen Nährböden wirkt 1 Proz. Dextrose schon wachstumhemmend, in flüssigen Kulturlösungen werden 3 Proz. noch gut vertragen.

Biophysikalische Eigenschaften.

Die Bestimmungen wurden auf Ammon-Agarnährböden gemacht.

Kardinalpunkte der Temperatur:

Minimum der Entwicklung zwischen 3—5°, Optimum zwischen 28—35° bei 32°.

Maximum der Temperatur für Sporenkeimung zwischen 45—47° C.

Maximum der Temperatur für Oidienwachstum zwischen 44—45° C.

Maximum der Temperatur für Sporenbildung zwischen 42—43° C.

Kardinalpunkte der Sauerstoffspannung.

Minimum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung zwischen 1—4, nahe bei 4 mg O im Liter.

Minimum der Sauerstoffspannung für Oidienwachstum zwischen 4—10, näher 4 mg O im Liter Luft.

Minimum der Sauerstoffspannung für Sporenbildung zwischen 4—10, näher 10 mg O.

Maximum der Sauerstoffspannung für Sporenkeimung zwischen 10—15, nahe 10 Atmosphären O.

Maximum der Sauerstoffspannung für Oidienwachstum zwischen 5—10, nahe 5 Atmosphären O.

Maximum der Sauerstoffspannung für Sporenbildung: 1—5 Atmosphären O.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Temperaturen:

a) von 100° C: Sporentötungszeit zwischen 11½—12½ Minuten,

b) von 80° C: Sporentötungszeit zwischen 9—10 Stunden.

Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Säuren.

a) Sporentötungszeit durch 16 Proz. Schwefelsäure = 50—105 Minuten,

b) Sporentötungszeit durch 16 Proz. Salzsäure oberhalb 10 Minuten.

Sporentötungszeit durch 16 Proz. Salzsäure unterhalb 40 Minuten.

Aufhebung des Wachstums durch Zusatz von 0,01 Proz. $ZnSO_4$ zum Nährboden.

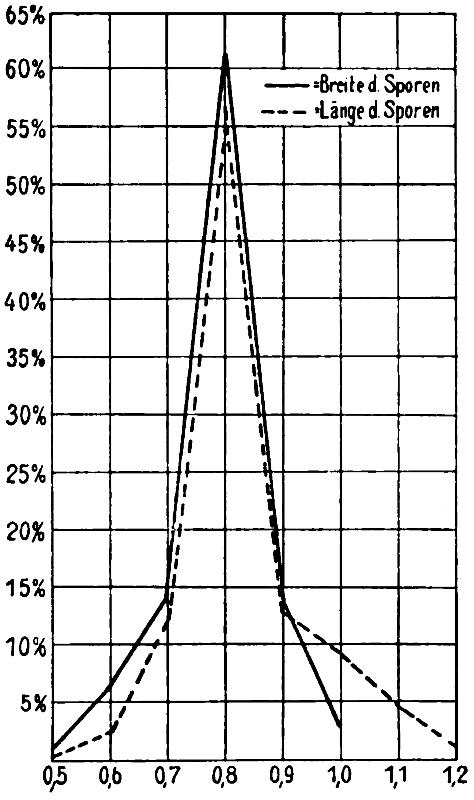
Aufhebung der Sporenbildung durch Zusatz von 0,008 Proz. $ZnSO_4$.

Biochemische Eigenschaften.

Von Eiweißabbauprodukten wurde in 5 Proz. Peptonbouillon + 0,2 Proz. Ammonkarbonat in geringer Menge Indol, in 1 Proz. Peptonbouillon mit Harnstoff oder Ammonkarbonat in deutlich nachweisbarer Menge Schwefelwasserstoff und Trimethylamin gebildet, dagegen kein Ammoniak (?). Gasbildung trat weder auf Zusatz von Kohlehydraten, noch auf Zusatz von ameisensaurem Natrium ein. Schleimbildung war besonders stark in einigen Wochen alter, mit Ammoniumkarbonat oder Harnstoff versetzter 1-proz. Peptonbouillon. Säurebildung ist wahrscheinlich, zumal auf zuckerhaltigen oder in zuckerhaltigen Nährmedien vorhanden. Iriserscheinung mit Newtons Farbenringen wurde beobachtet, die Farbenringe waren jedoch gewöhnlich wenig deutlich zu sehen. Die Ausscheidung von Calciumkarbonat und Phosphatkristallen in ⅓ D-Agarnährböden mit 2 und mehr Proz. Harnstoff wurde immer beobachtet. Farbstoffbildung wurde nicht bemerkt, ebensowenig Fluoreszenz und Leuchtfähigkeit.

Gelatineverflüssigung trat nach 2—3-jähriger Züchtung ein auf ⅓ D-Gelatine + 0,2 Ammonkarbonat. Amylase (Diastase) und Oxydase konnten nicht nachgewiesen werden, dagegen enthielten alle auf Katalase und Urease untersuchten Bouillonkulturen diese Enzyme. Reduktion von Neutralrot, das dem Ammon-Agar zugesetzt worden war, wurde ebenfalls beobachtet.

Es konnte auf tierphysiologischem Wege weder eine Giftbildung in Bouillonkulturen, noch eine krankheitserregende Eigenschaft der Bakterien selbst festgestellt werden.



Variationskurve der Sporengröße der Spezies „Bac. probatus“ auf Ammon-Agar. Berücksichtigt wurden insgesamt 585 Sporen.

Versuchsmaterial	Anzahl		Länge	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2 µ
Mein Originalstamm	400	Sporen	„	0	6	47	269	36	27	10	5
St. leubei Beijerinck	100	„	„	0	3	5	24	26	22	17	3
St. pasteurii Beijerinck	60	„	„	1	3	13	29	9	4	1	
St. B$_3$ Löhnis	25	„	„	1	2	5	11	4	2		
	585	„	„	2	14	70	333	75	55	28	8
	in Prozenten		„	0,34	2,4	11,9	57	12,8	9,4	4,8	1,36

Versuchsmaterial	Anzahl		Breite	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2 µ
Mein Originaistamm	400	Sporen	„	2	15	48	275	48	12		
St. leubei Beijerinck	100	„	„	1	9	14	48	26	2		
St. pasteurii Beijerinck	60	„	„	2	10	16	29	2	1		
St. B$_3$ Löhnis	25	„	„	1	4	5	11	3	1		
Gesamtzahl	585	„	„	6	38	83	363	79	16		
	in Prozenten		„	1,2	6,5	14	62	13,5	2,73		

Gezählt wurden nur Sporen, die auf Ammon-Agar vorbehandelt, fortgezüchtet und ausgereift waren.

Harnstoffspaltung.

Gehen wir von 10 Millionen Sporen der verschiedenen Stämme aus, die wir in 20 ccm Bouillon mit 1 Proz. Pepton und 2 Proz. Harnstoff ein-impfen, und lassen wir die Kulturen bei 28° C stehen, so beobachten wir bei einer bestimmten Stäbchenzahl auch eine annähernd entsprechende Harnstoffspaltung.

Bei rund 2100 Millionen 1-langer Oidien konnte noch keine Harnstoffspaltung festgestellt werden; bei rund 3600 Millionen 1-langer Oidien waren 36 Proz. des zugesetzten Harnstoffs gespalten, bei 4800 Millionen (von 26 Millionen Sporen ausgehend) 90 Proz. des zugesetzten Harnstoffs. Eine annähernd gleiche Proportionalität der Vermehrungsgröße zur Spaltungsgröße zeigten auch die anderen Stämme unserer Spezies (siehe im Abschnitt über den Vergleich, sowie in der Einleitung).

Literatur.

Abel, R., Bakteriologisches Taschenbuch. Würzburg 1910.

Abderhalden, E., Biochemisches Handlexikon. Berlin 1911/12.

—, Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden. Berlin 1910/11.

Baudet, Fl., Asporogene Milzbrandbazillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 60. 1911. p. 462—480.)

Behrens, Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 13. 1896. p. 1802.

Berghaus, Über die Ammoniakbildung bei einigen Bakterienarten. (Arch. f. Hyg. Bd. 54. 1908. p. 1—32.)

Behring, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 6. 1889. p. 127.

—, Beiträge zur Ätiologie des Milzbrandes. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 7. 1890. p. 173.)

Beijerinck, Anhäufungsversuche mit Ureumbakterien. Ureumspaltung durch Urease und durch Katabolismus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 33 ff.)

Benedict, R. u. Gephart, Fr., Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 30. 1909. p. 1760; Neubauer-Huppert 1910. p. 567.

Bierema, Die Assimilation von Ammon-Nitrat und Amidstickstoff durch Mikroorganismen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 708.)

Benecke, Bau und Stoffwechsel der Bakterien. 1912.

Billet, Compt. rend. de l'acad. d. scienc. 1885. p. 1252.

Blau, O., Über die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und der Sporenbildung, sowie die supramaximalen Tötungszeiten der Sporen der Bakterien usw. [Dissert.] Marburg 1905. (Auch Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1906.)

Breed, R., The Determination of the Number of Bakteria in Milk by direkt microscopical Examination. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. p. 337—340.)

Bredemann, G., Untersuchungen über die Variation und das Stickstoffbindungsvermögen des Bac. asterosporus A. M., ausgeführt an 27 Stämmen verschiedener Herkunft. Ein Beitrag zur Speziesfrage der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd, 22. 1908. p. 44—89.)

—, Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung mit besonderer Berücksichtigung des Stickstoffbindungsvermögens dieser Spezies. [Diss.] (Marburg 1908; auch Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 385—568.)

Brodmeyer, A., Über die Beziehung des Proteus vulgaris Hsr. zur ammoniakalischen Harnstoffzersetzung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 18. 1895. p. 380—391.)

Buchner, Longard u. Riedlin, Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 11. 1887. p. 1 ff.)

Burchard, A., Beiträge zur Kenntnis des Ablaufs und der Größe der durch Micrococcus ureae liquefaciens bewirkten Harnstoffzersetzung. (Arch. f. Hyg. Bd. 36. 1899. p. 264—284.)

Burri, Herteldt u. Stutzer, Bakteriologisch-chemische Forschungen über die Ursachen der Stickstoffverluste in faulenden organischen Stoffen, insbesondere im Stallmiste und in der Jauche. (Orig. im Journ. f. Landwirtsch. 1894. p. 329—384; Autoref. i. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 1. p. 284—289.)

Cambier, Annal. de micrograph. 1893. p. 322; auch in Miquel 1904. p. 80.

Cazeneuve et Livon, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 85. 1877. p. 571—574.)

Christensen, Über den Einfluß der Humusstoffe auf die Ureumspaltung. (Central. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. p. 337—362.)

Cohn, Beiträge z. Biologie d. Pflanzen. Bd. 1. 1872. p. 158—160.

Czapek, Biochemie der Pflanzen. Jena 1905.

—, Saccharophobie, Ref. im Centralbl. f. Bakt. Bd. 26. p. 84. (Orig. in Chiari-Festschrift, von Dittrich, Prag 1908.)

Dieudonné, Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt. Bd. 11. 1895. p. 508 f.

Duclaux, Traité de chimie biolog. p. 698, 701; auch in Miquel. 1898. p. 75.

Ellis, Beiträge zur Kenntnis der Coccaceen und Spirillaceen. I. Untersuchung über Sarcina, Streptococcus und Spirillen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1902. p. 1 f.; II. Der Nachweis der Geißeln bei allen Coccaceen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I.) I u. II als Dissertation. Marburg 1902.

Erdmann u. Winternitz, Über das Proteinochrom, eine klinisch und bakteriologisch bisher nicht verwertete Farbenreaktion. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16. 1903; München. med. Wochenschr. 1903. p. 982.)

Fischer, A., Die Plasmolyse der Bakterien. (Ber. d. kgl. sächs. Ges. d. Wissensch. Leipzig 1891.)

—, Über die Geißeln. Untersuchungen über Bakterien. (Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot. Bd. 27. 1894. p. 1 f.)

—, Vorlesungen über Bakterien. 2. Aufl. Jena 1903.

Flügge, Die Mikroorganismen. 3. Aufl. 1896.

Folin, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37. 1902—1903. p. 161; auch in Neubauer-Huppert. 1910. p. 533.)

—, Die vollständige Analyse eines 24-stündigen Urins. (Handb. d. biochem. Arbeitsmethod. Bd. 5. 1911. p. 281.)

Freudenreich, Annal. de micrograph. T. 3. p. 257.

Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme. Jena 1907.

Garbowski, Über Abschwächung und Variabilität bei Bacillus luteus Smith et Baker und Bacillus tumescens Zopf. [Diss.] Marburg 1907; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1907. p. 641 f.

Gill, Ailison u. Grindley, Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 31. p. 1078 f.; auch in Neubauer-Huppert 1910. p. 568.

Gottheil, Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. [Diss.] Marburg 1902; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 463 f.)

Greene, The soluble Ferments and Fermentation. 1899. p. 287.

Grimme, Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung in ihrer Wirkung auf die Membran, den Protoplasten und die Einschlüsse der Bakterienzelle. [Diss.] Marburg 1902; (Centralbl. f. Bakt. Orig. Abt. I. Bd. 32. 1902.)

Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig 1906.

Harding, The constancy of certain physiological characters in the classification of Bacteria. (Bull. New York agric. exp. Stat. 1910. No. 13.

Heim, Lehrbuch der Bakteriologie. 4. Aufl. 1911.

v. Jaksch, Studien über den Harnstoffpilz. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5. 1881. p. 395.)

Jensen, Die Hautlinien des natürlichen Bakteriensystems. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1909. p. 305—346.)

Jorns, A., Über Bakterienkatalase. (Arch. f. Hyg. Bd. 57. 1908. p. 134—162.)

Kellner, O., Über das Verhalten des Harnstoffs im Ackerboden. (Landw. Jahrb. Bd. 15. 1886. p. 712—717.)

Kiesel, A., Über den fermentativen Abbau des Arginins in Pflanzen. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75. 1911. p. 177 f.)

Klein, A., Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 27. 1900. p. 834.)

—, Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. (Arch. f. Hyg. Bd. 45. 1902. p. 117 f.)

—, Arch. f. Hyg. Bd. 59. 1906. p. 283.

—, Botanische Bakterienstudien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 6. 1889. p. 313.)

Kobert, Enzyme wirbelloser Tiere. (Pflüg. Arch. Bd. 99. 1903. p. 131.)

Kolle u. Wassermann, Handbuch d. pathogenen Mikroorgan. 1. Aufl. Jena.

Kossowicz, A., Einführung in die Agrikulturmykologie. 1. Bodenbakteriologie. Berlin 1912.

Kruse, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.

Koch, Jahresber. f. d. F. i. d. L. v. d. Gärungsorganism.

Ladureau, Compt. rend. de l'acad. des scienc. de Paris. T. 99. 1884. p. 897.

Lea, Sh., Some notes on the isolation of a soluble urea from the Torula urea. (Journ. of Physiol. Vol. 10. 1890. p. 226.)

Leube, Über die ammoniakalische Harngärung. (Virchows Arch. Bd. 100. 1885. p. 585 f.; Deutsch. med. Ztg. Bd. 7. 1885. p. 379. Autoref.)

— u. Graser, Sitzungsber. Erlangen 1885. p. 12.

Lehmann u. Neumann, Atlas u. Grundriß der Bakteriologie. 4. Aufl. 1907. 5. Aufl. 1911/12.

Lafar, Handb. d. techn. Mykologie. Jena 1904—07.

Liebert, The decomposition of uric acid by bacteria. (Acad. d. Wetenschapen Amsterdam. 1909. p. 61.)

Löhnis, Ein Beitrag zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung I. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904. p. 452.)

—, Zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung II. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 7.)

—, Über die Zersetzung des Kalkstickstoffs. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 397.)

—, Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffbakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 717 f.)

—, Handbuch d. landwirtschaftl. Bakteriol. Berlin 1910.

—, Praktikum d. landwirtschaftl. Bakteriol. Berlin 1911.

— u. Kuntze, (Centralbl. f. Bakt. Bd. 20. 1908. p. 680 f.)

Lunkewicz, Eine Farbenreaktion auf die salpetrige Säure der Kulturen der Cholerabazillen und einiger anderer Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. 1897. p. 945—949.)

Macé, Traité practique de Bactériologie. 5. éd. Paris 1904.

Maaßen, Arb. a. d. Kais. Gesundh.-Amt. Bd. 15. 1899. p. 512.

Machida, Bull. centr. agric. exp. stat. Japan. T. 1. 1907. p. 1.

Marchal, Bull. de l'Acad. de Belg. Sér. 3. T. 25. 1898. p. 766; nach Löhnis 1910.

Meyer, A., Studien über die Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien, ausgeführt an Astasia asterospora A. M. et Bac. tumescens Zopf. (Flora. Ergänzungsbd. Bd. 84. 1907. p. 185.)

—, Über Geißeln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien. (Flora. Bd. 86. 1899. p. 429.)

—, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fettpfropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydratlösung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. 1901. p. 809.)

—, Die Grundlagen und die Methoden für die mikroskopische Untersuchung von Pflanzenpulvern. Jena 1901.

—, Über die Verzweigung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 30. 1901. p. 49.)

—, Praktikum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903.

—, Erstes mikroskopisches Praktikum. 2. Aufl. Jena 1907.

—, Der Zellkern der Bakterien. (Flora. Bd. 98. 1908. p. 335.)

—, Apparat für die Kultur von anaëroben Bakterien und für die Bestimmung der Sauerstoffminima der Bakterienspezies für Keimung, Wachstum und Sporenbildung der Bakterienspezies. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1905.)

—, Apparat für die Kultur von Bakterien bei hohen Sauerstoffkonzentrationen, sowie zur Bestimmung der Sauerstoffmaxima der Bakterienspezies und der Tötungszeiten bei höheren Sauerstoffkonzentrationen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 386—398.)

—, Bemerkungen über Aerobiose und Anaërobiose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. 1. Orig. Bd. 49. 1909. p. 305.)

—, Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop. (Arch. f. Protistenk. Bd. 24. 1911. p. 78.)

—, Die Zelle der Bakterien. Jena 1912.

Migula, System der Bakterien. Bd. 1 u. 2. 1897. 1900.

Miquel, De la présence dans l'air du ferment de l'urée. (Bull. soc. chim. de Paris. T. 29. 1878. p. 387; T. 31. 1879. p. 391.)

—, Sur le ferment de l'urée soluble. (Compt. rend. de Paris. T. 111. 1890. p. 397.)

—, Annuaire de Montsouris. 1882. p. 464 f.

—, Études sur la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. (Annal. de microgr. T. 1. 1889; T. 2. 1889/90; T. 3. 1890/91; T. 5. 1893; T. 7. 1895; T. 8. 1896; T. 9. 1897.)

—, Étude de la fermentation ammoniacale et sur les ferments de l'urée. Paris 1898.

—, Die Vergärung des Harnstoffes, der Harnsäure und der Hippursäure. (Lafars Handb. d. techn. Mykol. Bd. 3. 1904. p. 71—85.)

Moll, Über die Antiurease. (Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2. 1902. p. 344.)

Musculus, Sur un papier réactif de l'urée. (Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 78. 1874. p. 132.)

—, Über die Gärung des Harnstoffs. (Pflüg. Arch. Bd. 12. p. 214; Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 83. 1876. p. 333.)

MacNeal, Latzer and Kerr, The fecal Bacteria of healthy men. (Journ. of infect. Dis. Vol. 6. 1909. p. 123—169, 571—609.)

Neide, Die Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als Speziesdiagnose, in Verbindung mit einer Untersuchung der für die Gramfärbung in Betracht kommenden Faktoren. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904.)

—, Botanische Beschreibung einiger sporenbildenden Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904. p. 1 f.; auch Diss. Marburg.)

Neubauer-Huppert, Analyse des Harns. Tl. 1. 1910.

Omelianski, Zur differentiellen Diagnostik der Mikroben. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34. 1903. p. 1 f.)

—, Ameisensaures Natron enthaltende Bouillon als Nährboden zur differentiellen Diagnostik der Mikroben. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 673.)

Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. 3. Aufl. Leipzig 1909.

Pasteur, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 50. 1860. p. 849—854; Annal. de Chim. et Phys. Sér. 3. T. 64. 1862. p. 56—57.)

— et Joubert, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 83. 1876. p. 1 f.

Pateur, Compt. rend. de l'acad. de Paris. T. 58. 1864. p. 142—150.

Peju, G., et Rajat, H., Note sur la polymorphisme des bactéries dans l'urée. Ref. in Kochs Jahresbericht Bd. 17. 1906. p. 60. (Orig. in Compt. rend. soc. biol. T. 61. p. 477.

Pfeffer, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Tl. 1. Leipzig 1897. Tl. 2. 1904.

Petri u. Maaßen, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh.-Amt. Bd. 8. 1893. p. 318.

Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen. Berlin 1910.

Porcher et Panisset, Sur la recherche de l'indol etc. (Compt. rend. soc. biol. T. 70. 1911. p. 369 f.)

Rahn, O., Die Verwendbarkeit von Kurven zur Deutung biochem. Vorgänge. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. 1910. p. 111.)

—, Die Stundengärleistung der Einzelzelle von Bacterium lactis acidi. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 375 f.)

—, The fermenting capacity of the average single cell of Bacterium lactis acidi. (Technical Bull. East Lansing Michigan 1912. No. 11.)

Reichert, Sichtbarmachung der Geißeln und Geißelbewegung der Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 51. 1909. p. 14 f.)

Rochaix, Sur quelques particularités des urobactéries. (Annal. de la soc. Linn. de Lyon. Bd. 57. 1911. p. 205—207.)

— et Dufourt, Contribution à l'étude des urobactéries. (Compt. rend. soc. biol. T. 69. 1910. p. 312—314.)

—, Remarques sur la réaction de Neutral-Rot. (Ebenda.)

Rona, Nachweis und Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Harn und in Faeces. (Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 3. 2. 1910. p. 765.)

Rothberger, Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 24. 1898. p. 513. Bd. 25. p. 15 u. 69.)

Rubner, Energieverbrauch im Leben der Mikroorganismen. (Arch. f. Hyg. Bd. 48. 1904. p. 260 f.)

Söhngen, Ureumspaltung bei Nichtvorhandensein von Eiweiß. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 91 f.)

Semal, Annal. de pharm. T. 4. 1898. p. 279; ref. Jahresber. d. Gär. Bd. 9. p. 205.

Severin, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 3. 1897. p. 713.)

—, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 617 f.

Shibata, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5. 1904. p. 388.

Schultz u. Julius, Farbstofftabellen. 1897.

Takeda, Der Nachweis von Trimethylamin im Harn. (Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129. 1909. p. 82—88.)

Takeuchi, Journ. of coll. agric. Tokyo. Vol. 1. No. 1. 1909.

Telle u. Huber, Kritische Betrachtungen über die Methoden des Indolnachweises in Bakterienkulturen usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911. p. 78.)

van Tieghem, Recherches sur la fermentation de l'urée et de l'acide hippurique. Thèse No. 256 de Paris. 1864; Compt. rend. de l'Acad. de Paris. T. 58. 1864. p. 210—264.)

Vahle, Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriaceen und Bakteriaceen, sowie die Rhodobakteriaceen und Spirillaceen. [Diss.] Marburg; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 25. 1909. p. 178—260.

Viehoever, A., Über den Nachweis von Chitin bei Bakterien. (Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellsch. Bd. 30. p. 443—452.)

—, Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien usw. (Auszug) Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellschaft 1913. Bd. 31. Heft 6. p. 285—289.

Warington, The chemical actions of some microorganisms. (Ref. i. Centralbl. f. Bakt. Bd. 6. 1888. p. 498.)

Winternitz, Über das Verhalten der Milch und ihrer wichtigsten Bestandteile bei der Fäulnis. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16.)

Winterberg, Zur Methodik der Bakterienzählung. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 29. 1898. p. 75.)

Wund, Feststellung der Kardinalpunkte der Sauerstoffkonzentration für Sporenkeimung und Sporenbildung einer Anzahl einer Reihe in Luft ihren ganzen Entwicklungsgang durchführender Bakterienspezies. [Diss.] Marburg 1906; Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 42. 1906. p. 97.

Zopf, Die Spaltpilze. Breslau 1883.

—, I. Zur Kenntnis der Organismen des amerikanischen Baumwollsaatmehls. II. Bacterium vernicosum. Beiträge zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen. Heft 1. Leipzig 1892. p. 91; Ref. in Kochs Jahresber. d. Gärungsorgan. Bd. 3. 1892. p. 91—92.

Einzell-Kultur.

Burri, R, Das Tuscheverfahren. Jena 1909.

Lindner, Mikrosk. Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 4. Aufl. Berlin 1905. p. 201 ff.

Schouten, S. L., Een methode voor het maken van reinculturen uitgaande van één onder het microscop geisoleerde cel. (Handel. v/h. 7e Nederl. Nat. en Gen. Congres, geh. te Haarlem 1899.)

—, On pure cultures of Saprolegniaceen. (These Proceedings 1901. March 30.)

—, Reinculturen uit één ondre het mikroskop geisoleerde cel. [Proefschrift.] Utrecht 1901.

—, Reinkulturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle. (Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. mikr. Technik. Bd. 22. 1905. p. 10.)

—, Pure cultures from a single cell, isolated under the microscope. (Proceed. of the Koninkl. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam. 1911.)

Tafelerklärung.

Alle Objekte 2400-fach vergrößert.

Fig. 1—3. Sporen verschiedener Form und Größe; frei oder in Hüllen.
Fig. 1. 3 Wochen alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 2. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur (1. Strichgeneration).
Fig. 3. 2 Wochen alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 4—8. Sporenkeimung polar und äquatorial.
Fig. 4—5. 6 Stunden alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 6—7. 6 Stunden alte Harnstoff-Mineralagarkultur.
Fig. 8. 5½ Stunden alte Ammon-Agarkultur (Geißelfärbung).
Fig. 9—11. Leere Hüllen, aus denen die Spore herausgetreten ist.
Fig. 9. 4 Wochen alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 10—11. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 12—23. Oidien verschiedener Form und Größe.
Fig. 12—14. Oidien auf ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff. 77. Kulturgeneration.
Fig. 15—17. 20 Stunden alte Ammon-Agarkultur.
Fig. 18—19. 8 Tage alte Nährgelatine + 0,1 Proz. Na_2CO_3; 8 Tage alte Nährgelatine + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammon. carb.
Fig. 20—22. 2 Tage alte Kartoffel-Kreidekultur.
Fig. 23. 2 Tage alte Ammon-Agarkultur. 130. Strichkulturgeneration, Geißelfärbung.
Fig. 24—33. Sporangien verschiedener Form und Größe.

Fig. 24. Sporangium mit 2 Sporen. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 25. 4 Wochen alte ⅓ D-Agar + 0,2 Proz. Harnstoffkultur. 17. Strichkulturgeneration des aus einer einzelnen Spore isolierten Stammes.

Fig. 26—27. 4 Wochen alte Kultur ⅓ D-Agar + 1 Proz. Na_2CO_3.

Fig. 28. 4 Tage alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 29. 8 Tage alte Harnstoff-Mineralagarkultur.

Fig. 30. 8 Tage alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 31. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur. 1 Woche bei 42° gewachsen, 3 Wochen bei 20° gestanden.

Fig. 32. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 33. 4 Tage alte Ammon-Agarkultur. 160. Strichkulturgeneration, Geißelfärbung.

Fig. 34—39. Hemangien-Sporangienreste.

Fig. 34—37. 2 Wochen alte Ammon-Agarkultur oder Kartoffel-Kreidekultur.

Fig. 38—39. 4 Wochen alte Ammon-Agarkultur (Geißelfärbung).

Fig. 40—41. Einzellige Fäden.

Fig. 40. 5 Tage alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 41. 4 Wochen alte Bouillon + 0,1 Proz. Na_2CO_3.

Fig. 42—44. Schwellformen (Involutionsformen).

Fig. 42. 8 Tage alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 43. 8 Tage alte ⅓ D-Agar + 2 Proz. Harnstoff.

Fig. 44. 4 Wochen alte Nährlösung I + 2 Proz. Harnstoff.

Fig. 45—49. Körnchen (Kern) und Vakuolen (Fig. 49) — Färbung in Oidien nach Zusatz von 10 Proz. Methylenblau.

Fig. 45—46. 3 Tage alte Ammon-Agarkultur.

Fig. 47. 5 Tage alte Nährgelatine alkalisch (0,1 Proz. Na_2CO_3).

Fig. 48—49. 11 Tage alte D-Gelatine + 2 Proz. Harnstoff + 0,3 Proz. Ammon. carb.

Fig. 50. Mikroidien. 2 Monate alte Bouillonkultur.

Fig. 51. Degenerationsformen mit Inhaltskörpern. 2 Tage alte bei 42° gezüchtete Ammon-Agarkultur.

Fig. 52—58. Geißelfärbung verschieden alter Kulturen.

Fig. 52. 6 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.

Fig. 53. 30½ Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.

Fig. 54. ca. 50 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar — Stamm Urobac. Leubei.

Fig. 55. 78½ Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.

Fig. 56. 1 Monat alte Kultur auf Ammon-Agar.

Fig. 57. 6 Monate alte Kultur auf Ammon-Agar.

Fig. 58. ca. 60 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar.

Fig. 59. ca. 70 Stunden alte Kultur auf Ammon-Agar. Kultur stand 2 Stunden bei 60°.

Fig. 60—62. Geißelzöpfe auf oft übergeimpften Ammon-Agarkulturen.

Fig. 63. Plasmolyse. 3 Tage alte Ammon-Agarkultur (10 Proz. NaCl).

Fig. 64. Sporen, Stäbchen, Sporangium im Dunkelfeld.

Nachdruck verboten.

Die Struktur des Verdauungsrohrs bei Dacus-Arten in Beziehung zu den symbiontischen Mikroorganismen.

Von Dr. **L. Petri**, Rom.
Pflanzenpathologische Anstalt.

Wie ich schon in einer früheren Arbeit bemerkt habe[1]), findet der ganze Lebenskreis von Dacus Oleae (Rossi) Meigen im Zusammenhange mit symbiontischen Bakterien statt. Diese Mikroorganismen sind bei der Larve in den Cardiastbindeschläuchen und bei dem vollendeten Insekt in den Schlund- und Afterdrüsen, sowie im Mitteldarm lokalisiert.

Es war vom großen Interesse, feststellen zu können, ob die besondere Struktur des Verdauungsrohrs der Olivenfliege, ganz anders als die der übrigen Dipteren, eine charakteristische, durch Anpassung an den Darmbakterienparasitismus hervorgerufene Eigenschaft darstellt, oder ob sie jeder Dacus-Art eigen ist.

Den größeren Teil des Materials für meine Untersuchungen verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Entomologen Professor E. Green vom K. Botan. Garten in Peradenya (Ceylon). Die systematische Arbeit wurde von Professor M. Bezzi (Turin) ausgeführt. Die Fliegen (in verdünntem Alkohol konserviert) waren soweit aufgeweicht, daß eine sorgfältige histologische Untersuchung nicht immer möglich war.

Die untersuchten Arten waren die folgenden:

1. Dacus longistylus Wied. Larven auf Oliven von Olea chrysophylla (Eritrea, Afrika).
2. Dacus (Cucurbitae Coquill., auf Cucurbita) Pepo (Ceylon).
3. Dacus zonatus W. W. Saund (= D. Persicae Bigot), auf Piper nigrum (Ceylon).
4. Dacus Garciniae Bezzi, auf Garcinia Xanthochymus Roxb. (Ceylon).
5. Dacus ferrugineus Fabr. (= D. Mangiferae Cotes), auf Mangifera indica (Ceylon) und auf Chrysophyllum cainito (Ceylon).
6. Dacus caudatus Fabr., auf Cucurbita Pepo (Ceylon).

Meine Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

Bei allen Larven der untersuchten Arten, diejenige von Dacus longistylus ausgenommen, enthalten die Mitteldarmblindschläuche weder Bakterien, noch sonstige Mikroorganismen. Die Peritrophica erfährt keine Ausstülpung in der Höhle dieser Divertikel, welche eine äußerst längliche, fingerartige Form besitzen. Bei der Olivenfliegenlarve haben die Blindschläuche einen Quer- und Längsdurchmesser von 350 und 500 μ, jene der Larve von Dacus ferrugineus 75 und 510 μ. Man findet diesen großen Unterschied in den beiden Durchmessern auch in den Blindschläuchen der Larven der anderen untersuchten Arten.

Bei der Larve von Dacus longistylus konnte ich symbiontische Bakterien wahrnehmen, deren morphologische Charaktere denen von D. Oleae entsprechen.

---

[1]) Ricerche sopra i batteri intestinali della Mosca olearia. (Memorie d. R. Staz. di Patolog. Veget. Roma (G. Bertero) 1909; vgl. auch Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 357.)

Bei einer Larve von D. Garciniae fand ich in den Verdauungsrohrblindschläuchen wenige Bakterien, welche höchstwahrscheinlich mit der Nahrung zufällig aufgenommen worden waren. Im Mitteldarm der Larve von D. ferrugineus sind sehr kleine Bakterien vorhanden (1—2 × 0,4—0,8 μ), deren Endigungen abgerundet sind.

Die Blindschläuche sind frei von Mikroorganismen. Bei den vollendeten Insekten der in Ceylon gesammelten Arten kann man stets die umpaarige Rückenschlundkopfdrüse auffinden, welche, wie bei der Olivenfliege, vor dem oberen Schlundganglion gebildet ist. Bei Dacus Cucurbitae und D. zonatus sind die Epithelzellen auf dem oberen Teil derselben Drüse außerordentlich entwickelt, jene an den Seiten bilden nach und nach ein Sekret, das wie eine Art Bekleidung aus Epithel erscheint und in der Nähe der Drüsenhöhle ein dünnes Häutchen bildet.

Dieses Häutchen streckt bei D. zonatus fadenartige Verlängerungen gegen das Innere derselben Höhle vor. In den Schlunddrüsen von D. Cucurbitae und D. zonatus fand ich wenige Bakterien und einige hefenähnlichen Zellen. Bei D. Garciniae waren diese Drüsen vollkommen leer, und die Epithelzellen schieden eine große Menge von Sekreten aus. Bei diesen Fliegen war der Mitteldarm vollständig frei von Bakterien; des schlechten Zustandes des Materials wegen konnte ich nur bei D. Cucurbitae die Afterdrüsen beobachten; sie waren hier weniger zahlreich als bei D. Oleae und frei von Mikroorganismen.

Diese Untersuchungen gestatten folgende Schlußfolgerungen:

Die spezielle Gestaltung des Verdauungsrohrs der Olivenfliege ist nicht als ein sekundärer, durch ein symbiontisches Verhältnis mit Bakterien hervorgerufener Charakter aufzufassen, sondern es ist diese Struktur jeder anderen Art von Dacus eigen.

Man kann als sekundäre, aus der Anpassung an diese Symbiose hervorgegangene Veränderungen die Durchmesserverkürzung der Cardiasblindschläuche bei der Larve und die Ausstülpung der Peritrophica in diesen Divertikeln betrachten.

Die ursprüngliche Ansteckung des Verdauungsrohrs von Dacus Oleae durch geduldete Mikroorganismen wird durch die Empfänglichkeit der Schlundkopfdrüse erklärt.

Die Tatsache, daß nur bei Dacus Oleae und D. longistylus, d. h. bei Parasiten des Ölbaums, eine konstante Symbiose mit Mikroorganismen stattfindet, führt uns zu der Annahme, daß diese als die Folge einer sekundären Eigentümlichkeit dieses Parasitismus zu betrachten ist. Was diese Annahme mehr berechtigt erscheinen läßt, ist die Tatsache, daß die symbiontischen Bakterien der Olivenfliege mit den Mikroorganismen, welche bei dem Ölbaum die Rotzkrankheit verursachen, identisch sind. Wahrscheinlich entstehen die Dacus-Arten, die heute auf Kosten der Oliven leben, aus Formen, welche ursprünglich auf anderen Pflanzen parasitierten.

Die Erwerbung der symbiontischen Bakterien steht im engen Zusammenhang mit der neuen Gastpflanze. Künftige Untersuchungen werden uns das Verhältnis zwischen der Verbreitung von Dacus Oleae, D. longistylus und des Ölbaumschmarotzers besser erklären, und damit könnte die obige Hypothese besser begründet erscheinen.

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. Otto Hamann,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Allgemeines, Lehrbücher usw.

Abel, Rudolf, Bakteriologisches Taschenbuch. Die wichtigsten technischen Vorschriften zur bakteriologischen Laboratoriumsarbeit. 17. Aufl. Würzburg (Kabitzsch) 1913. VI, 138 p. 8⁰. 2,— ℳ

Jahresbericht über das Gebiet der Pflanzenkrankheiten. Erstattet v. M. Hollrung. Bd. 14: das Jahr 1911. Berlin (Parey) 1913. VIII, 410 p. 8⁰. 20 ℳ.

Untersuchungsmethoden, Instrumente usw.

Barladean, A. G., Methoden der Wasserdestillation. (München. med. Wchnschr. Jg. 60. 1913. No. 29. p. 1601—1603. 2 Fig.)

Distaso, A., et **Martinez, J.,** Une méthode pour étudier les propriétés biologiques des microbes anaérobies. (Compt. rend. soc. biol. T. 75. 1913. No. 28. p. 201—202.)

Grimm, Berkefeld-Filter mit mechanischer Reinigung [D. R. Patent Endler]. (Mitt. d. K. Landesanst. f. Wasserhygiene Berlin-Dahlem. Heft 17. 1913. p. 40—60. 2 Fig.)

Hesse, Erich, Die Methoden der bakteriologischen Wasseruntersuchung unter besonderer Berücksichtigung des Nachweises mit dem Berkefeldfilter. (Arch. f. Hyg. Bd. 80. 1913. H. 1/6. p. 11—28.)

Hesse, Erich, Zur Technik der Methode des Nachweises von Keimen in Flüssigkeiten mit dem Berkefeld-Filter. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913. H. 5/6. p. 331—334).

Systematik, Morphologie.

Biers, P., Notes générales sur les champignons. 2. Le polymorphisme des champignons. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1022. p. 65—71. 22 Fig.)

Biers, P. M., Notes générales sur les champignons. 3. La Sexualité. Son intérêt pour la classification. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1026. p. 194—197. 43 Fig.)

Carpano, Matheo, Über die Kapselhülle einiger Bakterien (Streptococcus equi, Bact. equisepticum, suisepticum, mallei, typhi). (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 70. 1913. H. 1/2. p. 42—50. 1 Taf.)

Chatton, Edouard, et **Pérard, Charles,** Schizophytes du caecum du cobaye. 1. Oscillospira Guilliermondi n. g. n. sp. (Compt. rend. soc. biol. T. 74. 1913. No. 20. p. 1159—1162. 5 Fig.)

— —, Schizophytes du caecum du cobaye. (Compt. rend. Soc. biol. T. 74. 1913. p. 1232—1234. 10 Fig.)

Diels, L., Der Formbildungsprozeß bei der Blütencecidie von Lonicera Untergath. Periclymenum. (Flora N. F. Bd. 5. 1913. H. 2. p. 184—223. 2 Taf. u. 26 Fig.)

Fontanel, G., Les microbes invisibles. Thèse de Paris 1913. 8⁰.

von Keißler, Karl, Über die Gattung Symphosira. (Mykol. Centralbl. Bd. 2. 1913. H. 7. p. 321—325. 4 Fig.)

Kiesel, Alexandre, Changements morphologiques de l'Aspergillus niger en présence de divers acides et sels acides. (Ann. de l'Inst. Pasteur. Année 26. 1913. No. 6. p. 481—488. 2 Taf.)

Klebahn, H., Beiträge zur Kenntnis der Fungi imperfecti. (Mykol. Centralbl. Bd. 3. 1913. H. 2. p. 49—66. 15 Fig.)

—, Beiträge zur Kenntnis der Fungi imperfecti. 2. (Mykol. Centralbl. Bd. 3. 1913. H. 3. p. 97—115. 18 Fig.)

Kleine, R., Die Kümmelmotte Schistodepressaria nervosa Hw. Ein Beitrag zu ihrer Biologie und ihrer Bedeutung für die Landwirtschaft. (Ztschr. f. wiss. Insektenbiol. Bd. 9. 1913. H. 5; H. 6/7. p. 183—190. 17 Fig.)

Le Blaye, R., et **Fage, A.,** Note sur le parasite du Leptothrix [Trichomyces axillae]. (Compt. rend. Soc. biol. T. 74. 1913. No. 20. p. 1173—1174.)

Lindau, G., Über Medusomyces Gisevii, eine neue Gattung und Art des Hefepilzes. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Jg. 31. 1913. H. 5. p. 243—248. 1 Taf.)

Mercer, W. B., On the morphology and development of Phoma Richardiae n. sp. [Schluß]. (Mykol. Centralbl. Bd. 2. 1913. H. 7. p. 326—331. 1 Fig.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Nègre, L., Bactéries thermophiles des salles du Sahara. (Compt. rend. Soc. biol. T. 74. 1913. No. 14. p. 814—816.)

Patouillard, N., Sur un Septobasidium conidifère. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 156. 1913. No. 22. p. 1699—1701. 2 Fig.)

Petri, L., Disseccamento dei rametti di Pseudotsuga Douglasii Carr. prodotto da una varietà di Sphaeropsis Ellisii Sacc. (Ann. mycol. Vol. 11. 1913. No. 3. p. 278—280. 3 Fig.)

Sartory, A., et **Bainier, G.,** Etudes morphologiques et biologiques d'un Penicillium nouveau, Penicillium Petchii n. sp. (Ann. mycol. Vol. 11. 1913. No. 3. p. 272—277. 1 Taf.)

Severini, G., Secondo contributo alla conoscenza della Flora micologica della Provincia di Perugia. (Ann. di bot. Vol. 11. 1913. Fasc. 1. p. 191—207.)

Sydow, H., et **P.,** Novae fungorum species. 10. (Ann. mycol. Vol. 11. 1913. No. 3. p. 254—271. 8 Fig.)

Zacher, Friedrich, Die afrikanischen Baumwollschädlinge unter besonderer Berücksichtigung der von Busse und Kersting in Togo gesammelten Arten. (Arb. a. d. K. biol. Anst. f. Land- u. Forstw. Bd. 9. 1913. H. 1. 11 Fig.)

Biologie.

Arkwright, J. A., Natural variation of B. acidi lactici with respect to the production of gas from carbohydrates. (Journ. of hyg. Vol. 13. 1913. No. 1. p. 68—86.)

Benecke, W., Einige Fälle von Symbiose höherer Pflanzen mit Bakterien. (Berlin. klin. Wchnschr. Jg. 50. 1913. No. 30. p. 1389—1391.)

Bertraud, Gabriel, et **Sazerac, Robert,** Action favorable exercée par le manganèse sur la fermentation acétique. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 157. 1913. No. 2. p. 149—151.)

Bierry, H., et **Coupin, F.,** Sterigmatocystis nigra et lactose. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 157. 1913. No. 3. p. 246—247.)

Broili, J., und **Schikovra, W.,** Beiträge zur Biologie des Gerstenflugbrandes (Ustilago hordei nuda Jen.). Vorl. Mitt. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Bd. 31. 1913. H. 7. p. 336—339. 1 Fig.)

Ehrlich, Felix, Über einige chemische Reaktionen der Mikroorganismen und ihre Bedeutung für chemische und biologische Probleme. (Mitt. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau Bd. 6. 1913. H. 5. p. 705—713.)

Haehm, Hugo, Über Enzyme. (Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1913. No. 18. p. 225; No. 19. p. 240; No. 20. p. 251; No. 21. p. 264; No. 22. p. 275; No. 23. p. 285; No. 24. p. 298.)

Heinrich, Fr., Über das Amyloverfahren und die dabei verwendeten Organismen. (Ztschr. f. Spiritusindustrie. 1913. No. 25. p. 317—318.)

Javillier et **Tchernoroutzky, H.,** L'amygdalase et l'amygdalinase chez l'Aspergillus niger (Sterigmatocystis nigra v. Tgh.) et quelques hyphomycètes voisins. (Ann. de l'Inst. Pasteur. Année 26. 1913. No. 6. p. 440—449.)

Johannessohn, Fritz, Einfluß organischer Säuren auf die Hefegärung. [Diss. med.] Berlin 1913. 8⁰.

Kluyver, A. J., Die Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen. (Biochem. Ztschr. Bd. 52. 1913. H. 5/6. p. 486—493.)

Kopaczewski, W., Sur la dialyse de la maltase. (Ann. de l'Inst. Pasteur. Année 27. 1913. No. 7. p. 523—531.)

Lepierre, Charles, Non-spécificité du Zinc comme catalyseur biologique dans la culture de l'Aspergillus niger. Son remplacement par d'autres éléments. (Arquivos inst. bact. Camara Pestana. T. 4. 1913. Fasc. 1. p. 93—123.)

Lepierre, Charles, Rôle prépondérant du cadmium, du glucinium, du cuivre dans le développement de l'Aspergillus niger. (Bull. soc. Portugaise des sc. nat. Vol. 6. 1912. Fasc. 1. p. 10—21.)

Lindner, P., Die vermeintliche neue Hefe Medusomyces Gisevii. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Bd. 31. 1913. H. 7. p. 364—368. 1 Taf.)

—, Zur Naturgeschichte der Hefe. (Kosmos 1913. H. 1. p. 14—18. M. Abbild.)

—, Die wichtigsten Ergebnisse der Hefeforschung in den letzten 25 Jahren, mit besonderer Berücksichtigung der Arbeiten der Abteilung für Reinkultur. (Jahrb. d. Ver. d. Spiritusfabrikanten 1913. p. 371—387. M. Abbild.)

—, Das Wachstum einiger Hefen und Pilze in gleichprozentigen Alkohol- und Zuckerlösungen. (Wochenschr. f. Brauerei Jg. 30. 1913. No. 34. p. 457—460. M. Fig.)

Lindner, P. u. **Glaubitz,** Verlust der Zygosporenbildung bei anhaltender Kultur des +- und —-Stammes von Phycomyces nitens. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Bd. 31. 1913. H. 6. p. 316—318.)

Meißner, Richard, Zur Morphologie und Physiologie der Kahmhefen und der kahmhautbildenden Saccharomyceten. (Ztschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 3. 1913. H. 2. p. 113—211.)

Miehe, H., Über die Bakterienknoten an Blättern. (Verh. Ges. Dtschr. Naturf. 84. Vers. Münster 1912. 2. Teil. 1. Hälfte. p. 242—243.)

Muth, Fr., Der Botrytispilz in der Rebschule. (Mitt. d. Dtschn. Weinbauverb. Jg. 8. 1913. No. 9. p. 369—373.)

Neuberg, C., und **Rosenthal, P.,** Über zuckerfreie Hefegärungen 11. Weiteres zur Kenntnis der Carboxylase. (Biochem. Ztschr. Bd. 51. 1913. H. 1/2. p. 128—142.)

Peltrier, René, Les microbes des vins, cidres et poirés et les modifications qu'ils y produisent. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1025. p. 161—167.)

Pinoy, E., Sur la nécessité d'une association bactérienne pour le développement d'une Myxobactérie, Chondromyces crocatus. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 175. No. 1. 1913. p. 77—78.)

Rougentzoff, D., La fermentation de divers sucres par le B. coli et la production de l'indol. (Compt. rend. Soc. biol. T. 74. 1913. No. 19. p. 1098—1100.)

Ruot, Bacillus lactis fermenteus sprogène ferment butylène glycolique du sucre de lait. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 157. 1913. No. 4. p. 297—299.)

Schottelius, M., Bakteriologische Umschau. Gibt es Leben ohne Bakterien? (Kosmos 1913. H. 3. p. 81—85; H. 4. p. 125—127. M. Abbild.)

Severini, G., Intorno alle attività enzimatiche di due bacteri patogeni per le piante. (Ann. di bot. Anno 11. 1913. Fasc. 3. p 441—452.)

Spiegel, Über die Vernichtung von Bakterien im Wasser durch Protozoen und über die Fähigkeit der Bodonazeen, Bakterienfilter zu durchdringen. (Arch. f. Hyg. Bd. 80. 1913. H. 7/8. p. 283—301.)

Ventre, Jules, Influence des levures et de la constitution initiale des moûts sur l'acidité des liquides fermentés. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 157. 1913. No. 2. p. 154—156.)

—, Influence des levures sur les variations de l'extrait sec et de la glycérine dans les vins. (Compt. rend. Acad. Sc. T. 157. 1913. No. 4. p. 304—307.)

Wehmer, C., Übergang älterer Vegetationen von Aspergillus fumigatus in „Riesenzellen" unter Wirkung angehäufter Säure. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Jg. 31. 1913. H. 5. p. 257—268. 7 Fig.)

—, Keimungsversuche mit Merulius-Sporen. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Bd. 31. 1913. H. 6. p. 311—316.)

—, Hausschwammstudien. 3. Ansteckungsversuche mit verschiedenen Holzarten durch Merulius-Mycel. (Mykol. Centralbl. Bd. 2. 1913. H. 7. p. 331—340. 3 Fig.)

Zeiß, Heinz, Über die Einwirkung des Eosins auf Bakterien, Hefen und Schimmelpilze. (Arch. f. Hyg. Bd. 79. 1913. H. 4/5. p. 141—167.)

Zettnow, E., Über die abgeschwächte Zygosporenbildung der Lindnerschen Phycomyces-Stämme. (Ber. d. Dtschn. bot. Ges. Bd. 31. 1913. H. 7. p. 362—364. 3 Fig.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zur unbelebten Natur.

Luft, Wasser, Boden.

Bassalik, K., Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien und Hefen. 2. Mitt. (Ztschr. f. Gärungsphysiol. 1913. Bd. 3. H. 1. p. 15—42.)

Ciocalten, L'épandage agricole et les microbes. (Compt. rend. Soc. biol. T. 74. 1913. No. 24. p. 1411—1413.)

Ficker, M., Zur bakteriologischen Wasseruntersuchung. 1. Mitt. Der Nachweis von Bakterien durch das Berkefeldfilter. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 75. 1913. H. 1. p. 146—171.)

Gallot, La stérilisation des eaux par la lampe Cooper-Hewitt aux confins Algéro-Marocains. (Compt. rend. Assoc. Franç. pour l'avanc. d. sc. 41. sess. Nîmes 1912. p. 1064—1066.)

Goldschmidt, D., Epuration des eaux d'égout au moyen d'étangs à poissons. (Rev. d'hyg. et de police sanit. T. 35. 1913. No. 4. p. 472—479.)

Le Couppey de la Forest, Epuration des eaux d'égout. (Compt. rend. Assoc. Franç. pour l'avanc. d. sc. 41. sess. Nimes 1912. p. 1067—1072.)

Luther, Die Frage der Wasserversorgung vom hygienischen Standpunkt unter Berücksichtigung des preußischen Wassergesetzentwurfes. (Dtsch. Vierteljahrsschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. 1913. Bd. 45. H. 1. p. 139—166.)

de Montricher, Station d'épuration des eaux d'égout [Aix-en-Provence]. (Compt. rend. Assoc. franç. pour l'avanc. d. sc. 41. sess. Nimes 1912. p. 1072—1073.)

Reichle, Technisches über die Chlorkalk-Behandlung von Trinkwasser zentraler Wasserversorgungsanlagen zwecks Desinfektion. (Mitt. a. d. K. Landesanst. f. Wasserhyg. Berlin-Dahlem. H. 17. 1913. p. 117—127. 6 Fig.)

Rochaix, A., L'épuration des eaux destinées à l'alimentation publique. (Compt. rend. Assoc. franç. pour l'avanc. d. sc. 41. sess. Nîmes 1912. p. 1055—1064.)

Schulz, Konrad, Die Verbreitung der Bakterien im Waldboden. [Diss. med.] München 1913. 8⁰.

Watt, James, Purification of water supplies by the excess lime method. (Journ. of State med. Vol. 21. 1913. No. 8. p. 489—499.)

Milch, Molkerei.

Allemann, O., Beiträge zur Kenntnis der wissenschaftlichen Grundlagen der Käsefabrikation, mit besonderer Berücksichtigung der Verwendung von sogenannten Kunstlab bei der Herstellung von Emmentaler Käse. (Molkerei-Ztg. Berlin. Jg. 23. 1913. No. 38. p. 446—447.)

Arbeiten, Die, a. d. Gebiete d. Milchwissenschaft u. Molkereipraxis im Jahre 1912. I. u. II. Semester. Sammelreferat, begr. v. W. Raudnitz, fortgef. v. W. Grimmer. H. 16. 71 p. gr. 8⁰. Wien (F. Deuticke) 1913. 1,50 ℳ.

Auerbach, Über einen neuen Milchschnellkocher mit Rückkühlung zur tuberkulosefreien Aufzucht der Ferkel. (Mitt. d. Ver. Dtsch. Schweinezüchter. 1913. No. 12. p. 239—241. Mit 2 Abbild.)

Ernst, Wilh., Grundriß der Milchhygiene für Tierärzte. VIII, 301 p. m. 26 Abbild. u. 5 farb. Taf. Lex. 8⁰. Stuttgart (Enke) 1913. 8,— ℳ; geb. 9,40 ℳ.

Fettick, Otto, Schleimige Milch, durch den Bacillus mesentericus fuscus hervorgerufen. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1913. Jg. 23. H. 18. p. 416—419.)

Glage, Die Tätigkeit des praktischen Tierarztes bei der Milchkontrolle. (Berliner tierärztl. Wochenschr. Bd. 1. No. 25. p. 460—463; No. 26. p. 474—478.)

Gorini, Const., Beitrag zur Untersuchung der Milchsäurebakterien. (Milchw. Centralbl. 1913. H. 14. p. 417—424.)

Gorini, Cost., Die Verwendung von Bakterienreinkulturen bei der Butter- und Käsebereitung in Italien. (Int. agr.-techn. Rundsch. 1913. H. 4. p. 369—375.)

Grundsätze für die Gewinnung und Behandlung von Milch für den unmittelbaren Verkauf. (Molkerei-Ztg. Berlin. Jg. 23. 1913. No. 31. p. 362—363.)

Hering, F., Über hygienisch einwandfreie Milchaufbereitung. (Milchw. Centralbl. Jg. 1913. H. 13. p. 396—401.)

Herramhof, Heinrich, Rückblick auf die Apparate zur Untersuchung und Prüfung der Milch und ihrer Produkte. (Maschinen-Praxis. 1913. No. 17. p. 304—307. Mit Abb.)

Hewlett, R. Tanner, Villar, Sidney and **Revis, Cecil,** On the nature of the cellular elements present in milk. (Journ. of hyg. Vol. 13. 1913. No. 1. p. 87—92. 1 Taf.)

Hittcher, Die Bereitung von Milchpulver sowie von anderen Dauermilcharten. (Molkerei-Ztg. Hildesheim. 1913. No. 35. p. 675.)

Hittcher, Milchgewinnung und Milchverwertung. (Ztschr. f. Agrarpolitik Jg. 1913. No. 7. p. 225—235.)

Hoffmeister, O., Zur Bestimmung des Schmutzgehaltes der Milch. (Der Landbote. Ztschr. d. Landw.-Kammer f. Brandenb. 1913. No. 15. p. 401—405. 5 Fig.)

Hußmann, Josef, Pasteurisierte Milch. (Wiener landw. Ztg. 1913. No. 51. p. 593.)

Kühl, Hugo, Trockenmilchpräparate. Eine nahrungsmittel-hygienische Studie. (Hyg. Rundsch. Jg. 23. 1913. No. 12. p. 709—713.)

—, Untersuchung über die Konservierung der Butter [spez. f. Tropenversand]. (Dtsch. Vierteljahrsschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. 1913. H. 2. p. 261—267.)

Kürsteiner, J., Wie erhält man in Käsereien am einfachsten und sichersten vollkommen klare, für den Labansatz geeignete Schotte? (Molkerei-Ztg. Berlin. Jg. 23. 1913. No. 30. p. 349—351.)

Lauterwald, Franz, Die Gewinnung und Behandlung der Milch. (Molkerei-Ztg. Berlin Jg. 23. 1913. No. 33. p. 386—388.)

Lobeck, O., Neues Verfahren zum Entkeimen von Milch und seine Apparatur. (Molkerei-Ztg. Hildesheim. Jg. 27. 1913. No. 57. p. 1105—1107. 3 Fig.)

Martin, Wilhelm, Untersuchungen über die chemische und biologische Veränderung, sowie über die Infektiosität der Milch maul- und klauenseuchekranker Kühe. (Arb. a. d. bakt. Labor. d. städt. Schlachthofs Berlin. H. 4. Leipzig (Nemnich) 1913. 40 p. 8⁰. 1 Taf.) 1,20 ℳ.

Nicolae, Oskar, Fermentierte Milch. (Bayer. Molkerei-Ztg. 1913. No. 20. p. 229—231.)

Regelung des Verkehrs mit Milch in Preußen. (Mitt. d. Dtsch. milchwirtsch. Vereins. 1913. No. 5. p. 70—79; Grundsätze f. d. Regelung d. Verkehrs mit Kuhmilch als Nahrungsmittel f. Menschen. Ebenda p. 79—97.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Reuchlin, E., und **Rachel, F.**, Beiträge zur Käseuntersuchung. (Ztschr. f. d. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 26. 1913. H. 1. p. 20—38.)

Rosam, A., Eine einfache mikroskopische Beurteilung des Gehalte der Milch an Mikroorganismen. (Milchwirtsch. Centralbl. 1913. H. 11. p. 333—334.)

Schaller, Bericht über die im Jahre 1912 für Molkereien und Milchabsatzgenossenschaften vorgenommenen Milchuntersuchungen. (Badisches landw. Wochenbl. 1913. No. 14. p. 383—386.)

Schloßmann, Artur, Über keimfreie Rohmilch. (Arch. f. Kinderheilk. Bd. 60/61. 1913. Festschr. f. Baginsky. p. 676—688.)

Schwarz, Entstehung, Wesen und Eigenschaften der Milch, ihre Gewinnung und Behandlung vom Erzeugnis- bis zum Verbrauchsort. (Milchwirtsch. Centralbl. 1913. No. 8. p. 238—250.)

Siegfeld, M., 14 Jahre Untersuchung ostfriesischer Butter und weitere Beiträge zur Butterbeurteilung. (Ztschr. f. d. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 25. 1913. H. 12. p. 689—703.)

Skar, Olav, Verhalten der Leukozyten der Milch bei der Methylenblau-Reduktaseprobe. (Ztschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene Jg. 23. 1913. H. 19. p. 442—447.)

Ströse, A., Eine Prüfung des Auerbachschen Milchschnellkochers. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1913. Jg. 23. H. 17. p. 385—387.)

Weigmann, H., Die Pasteurisierung der Marktmilch. (Molkerei-Ztg. Hildesheim. Jg. 27. 1913. No. 67. p. 1297—1300.)

Wiegert, Elisabeth, Zur Bereitung und Anwendung von Yoghurtmilch. (Molkerei-Ztg. Berlin. Jg. 23. 1913. No. 28. p. 326—328.)

Bier, Bierbereitung.

Henneberg und **Bode**, Die Gärungsgewerbe und ihre naturwissenschaftlichen Grundlagen. (Wochenschr. f. Brauerei Jg. 30. 1913. No. 34. p. 463—464.)

Keil, H., Die sogenannte kochende Gärung. (Wchnschr. f. Brauerei. 1913. No. 24. p. 240—344.)

Lindner, P., Untersuchungen von Bottichholzspänen auf Infektionskeime. (Wchnschr. f. Brauerei. Jg. 30. 1913. No. 33. p. 450—451. 1 Fig.)

Schlesinger, Julius, Über die biologische Betriebskontrolle mehrerer Brauereien von einer Zentrale aus. (Allg. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabr. Jg. 41. 1913. No. 31. p. 383—384.)

Windisch, W., und **Klein, J.**, Über die Benutzung von Bacillus Delbrücki zur Säuerung von Brauereimaischen, sowie über den Einfluß der Säuerung auf die Zusammensetzung der Würze. (Wochenschr. f. Brauerei Jg. 30. 1913. No. 38. p. 501—504.)

Wein, Weinbereitung.

von der Heide, C., Das Entsäuern der Weine und Moste. (Mitt. d. Dtschn. Weinbau-Verb. Jg. 8. 1913. No. 8. p. 329—339.)

Leron, Jean, Conseils pour la pasteurisation. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1023. p. 115—117.)

Schätzlein, Chr., Über den Säurerückgang des Weines und seine Bedeutung für die Praxis. (Mitt. d. Dtschn. Weinbauverb. Jg. 8. 1913. No. 9. p. 373—397.)

Thouret et **Vidal**, Traitements contre la pourriture grise du raisin. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1023. p. 117—118.)

Vincens, J., La désacidification des mouts. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1028. p. 264—266.)

Fleisch.

Grunt, O., Beitrag zur Frage des physiologischen Vorkommens von Bakterien im Fleische gesunder Schlachttiere. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. 1913. Jg. 23. H. 17. p. 387—388.)

Kalender für Fleischbeschauer und Trichinenschauer f. d. J. 1913. Hrsg. v. Waldem. Bonatz. Hannover (Schaper) 1913. 107 u. 16 p. 8°. 1,50 ℳ.

Andere Nahrungsmittel.

Bodin, E. et **Chevrel, F.**, La solution du problème de la prophylaxie des accidents infectieux d'origine ostréaire par la stabulation des huitres en eau de mer filtrée. (Rev. d'hyg. et de police sanit. T. 35. 1913. No. 4. p. 385—392.)

Daumězon, G., Sur une contamination microbienne de l'oeuf de poule. (Compt. rend. soc. biol. T. 74. 1913. No. 23. p. 1333—1334.)

Henneberg, W., Die Verwendung der Milchsäurebakterien zur Haltbarmachung von Nahrungs- und Genußmitteln. (Die Dtsch. Essigindustrie. 1913. No. 18. p. 193—195; No. 19. p. 206—208.)

—, Die Verwendung der Milchsäurebakterien zur Haltbarmachung von Nahrungs- und Genußmitteln. (Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1913. No. 25. p. 311; No. 26. p. 325.)

Kühl, Hugo, Über den Einfluß niedriger Temperatur auf die Zersetzung der Nahrungsmittel. (Hyg. Rundsch. Jg. 23. 1913. No. 17. p. 1025—1028.)

Treue, E., Die Sauberkeit im Verkehr mit pflanzlichen Nahrungs- und Genußmitteln. (Centralbl. f. allg. Gesundheitspfl. Jg. 32. 1913. H. 3/4. p. 104—119.)

Valagussa, Francesco, Sull' importanza della presenza degli ifomiceti nelle farine impiegate per l'alimentazione del bambino. (In onore Angelo Celli. 25. anno di insegn. Torino 1913. p. 99—111.)

Valeri, G. B., Sul contenuto batterico del sale da cucina e sua reale importanza pratica per l'igiene. (In onore Angelo Celli. 25. anno di insegn. Torino 1913. p. 113—125.)

Wohnungen, Abfallstoffe, Desinfektion usw.

Haïri, Ekrem, Über den Einfluß der organischen Substanzen auf die Desinfektion des Trinkwassers mit Chlor. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 75. 1913. H. 1. p. 40—48.)

Spillner, F., Die Desinfektion des Trinkwassers mit chlorhaltigen Mitteln. (Verh. d. Ges. Dtschr. Naturf. 84. Vers. Münster 1912. 2. Teil. 1. Hälfte. p. 142—146.)

Stoklass, Jul., Maßnahmen gegen die Verunreinigung der Gewässer und die Staub- und Rauchschäden. (Wiener landw. Ztg. 1913. No. 57. p. 653—655.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.

Krankheitserregende Bakterien und Parasiten.

Bailly, Maurice, Sur une invasion de mildiou. (Rev. de viticult. Année 20. 1910. No. 1019 p. 876—877. 2 Fig.)

Beyer, Pourquoi les maladies cryptogamiques deviennent si redoutables? (Rev. deviticult. Année 20. 1913. No. 1023. p. 118—121.)

Brunet, Raymond, Le mildiou. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1019. p. 887.)

Capus, J., Les facteurs des invasions de mildiou. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1027. p. 228—232.)

Correns, C., Sordago, eine nach den Mendelschen Gesetzen vererbte Blattkrankheit. (Verh. d. Ges. Dtschr. Naturf. 84. Vers. Münster 1912. 2. Teil, 1. Hälfte. p. 250—252.)

Eriksson, Jakob, Die Pilzkrankheiten der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 246 p. m. 300 Abb. 8⁰. Leipzig (Reichenbachsche Verlag) 1913.

Gehrmann, Karl, Krankheiten und Schädlinge der Kulturpflanzen auf Samoa. (Ber. a. d. Reichskolonialamt über pflanzenpatholog. Unters. i. J. 1910. (Arb. a. d. K. biol. Anst. f. Land- u. Fostw. Bd. 9. 1913. H. 1.)

Hauman-Merck, Lucien, Contribution à l'étude des altérations microbiennes des organes charnus des plantes. (Ann. de l'inst. Pasteur. Année 27. 1913. No. 7. p. 501—522.)

Klebahn, H., Bericht über die in den Jahren 1908—1912 zur Erforschung und Bekämpfung der Selleriekrankheiten in den Hamburger Marschlanden angestellten Untersuchungen und Versuche. (Aus: „Jahrb. d. hamb. wiss. Anstalten“. 3. Beih.) 57 p. m. 2 Taf. Lex. 8⁰. Hamburg (L. Gräfe & Sillem) 1913.

Köck, G., Die wichtigsten Kartoffelkrankheiten und ihre Erkennung auf dem Felde. (Monatsh. f. Landw. 1913. H. 7. p. 211—214. Mit 2 Abbild.)

Labergerie, Une attaque de mildiou bien précisée. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1021. p. 55—56.)

Marchal, P. et **Feytaud, J.,** Les données nouvelles sur le Phylloxéra. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1020. p. 5—11; No. 1021. p. 33—41; No. 1023. p. 104—110. 1 Taf. u. 36 Fig.)

Morstatt, H., Beobachtungen über das Auftreten von Pflanzenkrankheiten im Jahre 1912. (Der Pflanzer. 1913. No. 5. p. 211—224. Mit 4 Abbild.)

—, Liste schädlicher Insekten. (Der Pflanzer. 1913. No. 6. p. 288—296.)

Müller, Karl, Die Peronospora-Krankheit der Reben und ihre Bekämpfung. 12 p. m. 5 Fig. gr. 8⁰. Stuttgart (Ulmer) 1913. (Flugblatt d. Hauptstelle f. Pflanzenschutz i. Baden No. 1.)

—, Die Peronospora-Krankheit der Reben und ihre Bekämpfung. (Badisches landw. Wchnbl. 1913. No. 21. p. 555; No. 22. p. 592.) (Als Flugbl. zu beziehen d. d. Großh. landw. Vers.-Anst. Augustenburg b. Grötzingen i. Baden.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Osterwalder, A., Bemerkungen zu Josef Weese: Studien über Nectriaceen. (Ztschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 3. 1913. H. 2. p. 212—213; hierzu Entgegn. v. Weese. Ibid. p. 214—223.)

Reed, Howard S., and **Cooley, J. S.,** The transpiration of apple leaves infected with Gymnosporangium. (Botan. Gaz. Vol. 55. 1913. No. 6. p. 421—430. 1 Fig.)

Reuther, Die Fußkrankheit des Weizens. (Deutsche landw. Presse. 1913. No. 65. p. 780; Illustr. landw. Ztg. No. 65. p. 589—591.)

Riehm, E., Über einige wichtigere, pilzparasitäre Pflanzenkrankheiten behandelnde Arbeiten der Jahre 1912/13 (Schluß). (Mykol. Centralbl. Bd. 3. 1913. H. 2. p. 66—76.)

Roberts, J. W., The "rough-bark" disease of the yellow newtown apple. (U. S. Dep. of Agric. Bur. of Plant Ind. 1913. Bull. 280. 15 p. m. 2 Taf.)

Rutgers, A. A. L., The Fusariums from cankered cacao-bark and Nectria cancri nova species. (Ann. du Jardin bot. de Buitenzorg. Sér. 2. Vol. 12. 1913. 1.re Partie. p. 59—63. 4 Taf.)

—, Hevea-kanker. (Dep. van Landbouw, Nijverheid en Handel. Mededeelingen van het Afdeeling voor Plantenziekten. No. 2.) Buitenzorg 1912: Dr. van het Dep. 8 p. 4°.

—, Onderzoekingen over den cacaokanker. (Dep. van Landbouw, Nijverheid en Handel. Mededeelingen van de Afdeeling voor Plantenziekten. No. 1.) Batavia: Kolff (in Komm.) 1912. 30 p. 4°.

Sajó, Karl, Die Mehl- und Dürrobstmotten. (Prometheus 1913. Jg. 24. [No. 1230] No. 34. p. 529—531; [No. 1231] No. 35. p. 549—553; [No. 1232] No. 36. p. 566—570. Mit 8 Abbild. (Schluß folgt.)

Scheibener, Edmund, Der Birnrost [Gymnosporangium Sabinae]. (Gartenwelt. Jg. 17. 1913. p. 131—136. 9 Fig.)

Scheidter, Franz, Über Generation und Lebensweise des bunten Erlensüßlers, Cryptorhynchus lapathi L. (Naturw. Zeitschr. f. Forst- u. Landw. 1913. H. 5/6. p. 279—300. Mit 6 Abbild.)

Schouteden, H., Les hémiptères parasites du caféier en Afrique. (Rev. Zool. Africaine Vol. 2. 1912. Fasc. 1. p. 19—34. 1 Taf., 9 Fig.)

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Viehoever, Arno, Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien mit besonderer Berücksichtigung der speziesdiagnostisch verwertbaren Merkmale und des Vermögens der Harnstoffspaltung, p. 209.

Petri, L., Die Struktur des Verdauungsrohrs bei Dacus-Arten in Beziehung zu den symbiotischen Mikroorganismen, p. 360.

Neue Literatur, p. 362.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 29. Oktober 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 15|17.
Ausgegeben am 29. November 1913.

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis von Cladothrix dichotoma Cohn.

Von Dr. **P. Linde.**

Mit 7 Textfiguren.

Über Cladothrix dichotoma Cohn besitzen wir bereits eine größere Anzahl eingehender Untersuchungen. Dennoch schien es gerechtfertigt, eine nochmalige Bearbeitung dieses Fadenbacteriums vorzunehmen, da die letzte jener Arbeiten, eine Veröffentlichung Höflichs aus dem Jahre 1901, bereits über ein Jahrzehnt zurückliegt und dem jetzigen Stande der bakteriologischen Forschung, die besonders in den letzten 10 Jahren erhebliche Fortschritte gemacht hat, nicht mehr gerecht wird. Es war das Ziel dieser Arbeit, unter Berücksichtigung der neueren Forschungsergebnisse genaue morphologische und zytologische Untersuchungen vorzunehmen. Die Physiologie des Organismus bot neben dem rein wissenschaftlichen Interesse noch ein praktisches, da Cladothrix dichotoma zu denjenigen Bakterienformen gehört, die in der biologischen Selbstreinigung der Abwässer eine hervorragende Rolle spielen. Schließlich sollte als Drittes eine nochmalige Untersuchung der Angaben Zopfs vorgenommen werden. Zopf hatte in seiner Arbeit aus dem Jahre 1882 in Übereinstimmung mit Cienkowski besonders Cladothrix dichotoma als eine Bakterienform beschrieben, der eine große Bedeutung bei der sogenannten „Bakterienerzeugung“ zukommen sollte. Doch seine Angaben fanden bald Widerspruch. Bereits wenige Jahre später wies Winogradsky die Angaben Zopfs entschieden zurück, da er sich durch eigene Beobachtungen davon überzeugt hatte, daß „der genetische Zusammenhang“ der einzelnen Formen nicht vorhanden war. Einen großen Fortschritt bedeutete es, als es Büsgen im Jahre 1894 gelang, Cladothrix dichotoma in Reinkultur zu züchten. Auch ihm kam es im wesentlichen darauf an, auf Grund der Reinkultur eine genaue Nachuntersuchung der Angaben Zopfs über den Pleomorphismus dieser Form vorzunehmen. Das Resultat seiner Untersuchungen war eine Bestätigung der Angaben Winogradskys und damit eine endgültige Widerlegung der Ansicht Zopfs. Es folgte dann die schon oben erwähnte Arbeit Höflichs, in welcher der Verfasser auch Stellung gegen Zopf nahm. Schienen diese Fragen somit einer nochmaligen Bestätigung nicht zu bedürfen, so wurden sie doch dadurch für mich von besonderem Interesse, daß in der Zeit, während ich mit diesen Untersuchungen beschäftigt bin, eine Arbeit von Ellis erschien, in welcher der Verfasser viele von den Angaben Zopfs bestätigt und dadurch die früher viel umstrittene Ansicht Zopfs über den Pleomorphismus der Bakterien wieder aktuell macht.

Im Anschluß an diesen letzten Teil sollte noch folgendes berücksichtigt werden. Man findet in der bakteriologischen Literatur (z. B. bei Migula) häufig die Angabe, daß Cladothrix dichotoma identisch sei mit einer Form, die unter eigenem Gattungsnamen geht, mit Sphaerotilus natans. Außerdem soll nach einer Angabe, die auf Zopf zurückgeht, eine in faulendem Wasser häufig auftretende Bakterienform, die Zoogloea ramigera, in den Entwicklungsgang von Cladothrix dichotoma hineingehören. Es sollen also sowohl Sphaerotilus natans, als auch die Zoogloea ramigera nur Wachstumsformen von Cladothrix dichotoma sein, die bedingt werden durch ökologische Verhältnisse.

Ich möchte hier unter Hinweis auf den letzten Teil dieser Arbeit vorausnehmen, daß ich auf Grund meiner Untersuchungen zu der Überzeugung gekommen bin, daß die als Cladothrix dichotoma und Sphaerotilus natans beschriebenen Organismen identisch sind. Derselben Ansicht ist Kolkwitz. Nach ihm ist „Cladothrix dichotoma in der Regel, besonders bei einem Zelldurchmesser von 2 μ identisch mit pseudoverzweigten Exemplaren von Sphaerotilus". Von rein historischem Interesse ist, daß Kützing bereits im Jahre 1833 Sphaerotilus natans als Artbezeichnung wählte, während Cohn bekanntlich erst viele Jahre später Cladothrix dichotoma als neue Spezies beschrieb. Es würde somit also dem Namen Sphaerotilus natans Kützing das Prioritätsrecht vor der Cladothrix dichotoma Cohn zukommen. Wenn ich den von mir untersuchten Organismus dennoch als Cladothrix dichotoma Cohn bezeichne, so geschieht dies aus folgendem Grunde: Die Beschreibung und Abbildungen, die Kützing zu seinem Sphaerotilus natans gibt, lassen zwar die Deutung mit großer Wahrscheinlichkeit zu, daß hier bereits die Cladothrix dichotoma Cohns beschrieben wird, aber doch sind die charakteristischen Merkmale nicht scharf hervorgehoben. Dagegen ist die Beschreibung Cohns so genau, daß eine Identifizierung der Form ohne weiteres möglich ist. Außerdem ist der Name Cladothrix dichotoma in der Literatur gut eingebürgert.

Literatur.

Acosta und y Grande Rossi, Crón. Méd.-quirúrg. de la Habana. 1893. No. 3; Referat in Kochs Jahresber. Bd. 4. 1893. p. 55.

Büsgen, Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch. Bd. 12. 1894. p. 147—152.

Casabo, Crónica méd.-quirúrg. de la Habana. 1894; Ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. 17. 1895.

Cienkowski, Zur Morphologie der Bakterien. (Mém. de l'Acad. de St. Pétersbourg. Sér. VII. T. 25. 1877. No. 2.)

Cohn, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd. 1. 1875. p. 185.

Ellis, Proc. Roy. Soc. Vol. 85. 1911. p. 344—358.

Eidam, Jahresber. d. Schles. Gesellsch. f. vaterl. Kult. 1876. p. 133.

Eppinger, Zieglers Beiträge. IX. 1891.

Fischer, A., Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 27. 1895. p. 1—163.

Fischer, B., Zeitschr. f. Hyg. Bd. 13. 1893.

Flügge, Die Mikroorganismen. Bd. 2. 1896.

Garten, Deutsch. Zeitschr. f. Chir. Bd. 41. 1895. p. 257.

Günther und Rullmann, Centralbl. f. Bakt. Bd. 2. 1896.

Hesse, Deutsch. Zeitschr. f. Chir. Bd. 34.

Höflich, Österr. Monatsschr. f. Tierheilk. Jahrg. 26. 1901. Bd. 1. u. 2.

Kedzior, Arch. f. Hyg. Bd. 27. 1896.

Kolkwitz, Lafars Handb. d. Mykol. Bd. 3. p. 409 ff.

—, Wasser und Abwasser. (Handb. d. Hyg. Leipzig 1911.)

Kützing, Linnaea. Bd. 8. 1833. p. 385.

Macé, Compt. Rend. de l'Acad. d. Scienc. 1888.

Migula, System der Bakterien. Bd. 2. p. 1033.

Naunym, Mitteil. der Klin. Königsberg. 1888. p. 297.

Rullmann, Chemisch-bakteriologische Untersuchungen von Zwischendeckfüllungen

mit besonderer Berücksichtigung von Cladothrix odorifera. [Dissert.] München 1895.
—, Lafars Handb. d. Mykol. Bd. 3. p. 198.
Russel, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 11.
Sauvageau et Radais, Compt. Rend. de l'Acad. d. Scienc. T. 104. 1892.
Schikorra, Zeitschr. f. Fischer. Jahrg. VII. 1899.
Tschierschke, [Dissert.] Leipzig 1891. (Nicht gedruckt, vgl. Höflich und Ellis.)
Winogradsky, Beitr. z. Morphol. u. Physiol. d. Bakterien. Leipzig 1888.
—, Botan. Zeitung. 1888.
Winter, Rabenhorst, Kryptogamen-Flora. Leipzig 1884.
Zopf, Morphologie der Spaltpflanzen. Leipzig 1882.

Eine Ergänzung finden diese Literaturangaben in einzelnen Originalabhandlungen und Referaten in dem „Centralbl. f. Bakt.". Diese Arbeiten, in denen die Form teils als Cladothrix dichotoma, teils als Sphaerotilus natans beschrieben wird, berücksichtigen vorzugsweise die Biologie beider Organismen. Da diese Angaben in der Hauptsache nur den Abwasserbiologen interessieren und außerhalb des Rahmens dieser Untersuchungen liegen, so ist hier die Aufzählung vermieden worden.

Aber auch die oben angeführten Arbeiten beschäftigen sich keineswegs alle speziell mit Cladothrix dichotoma bzw. Sphaerotilus natans; doch versprach ihre Berücksichtigung insofern ein Interesse, als die Autoren die von ihnen beschriebenen Formen mit Cladothrix in eine Gattung stellen, teilweise sogar sie mit dieser fälschlicherweise identifizieren. So stellt Eppinger seine Cladothrix asteroides deshalb zu den Cladothricheen, weil „sie durch aus Zellen zusammengesetzte, mit einer Scheide versehenen Fäden mit sogenannter Scheinverzweigung ausgezeichnet ist". Aber in den Abbildungen, die Eppinger zu seiner Arbeit gibt, läßt sich deutlich eine „echte" Verzweigung der einzelnen Zellen erkennen, eine Verzweigung, die jedenfalls vollkommen verschieden ist von der bei Cladothrix auftretenden „Scheinverzweigung". Auf Grund ihrer sonstigen Morphologie und Physiologie ist die Cladothrix asteroides von Flügge, Höflich u. a. in die Gattung Streptothrix eingereiht worden. Bezüglich der Arbeiten von Acosta und Rossi, B. Fischer, Garten, Günther, Rullmann, Hesse, Kedzior, Macé, Naunym und Tschierschke möchte ich mich der Ansicht Höflichs anschließen, daß die in diesen Arbeiten beschriebenen Organismen zur Gattung Streptothrix gehören. Soweit aus dem oben angeführten Referat über die Arbeit Casabos die Beurteilung möglich ist, gehört seine Cladothrix chromogena wohl keinesfalls zu den echten Cladothricheen; die Angaben Russells über seine Cladothrix intricata sind nicht so weitgehend, daß man diese Form mit Cladothrix dichotoma zusammenstellen dürfte.

Schließlich sei noch hier auf diejenigen Arbeiten besonders hingewiesen, die dadurch für die vorliegenden Untersuchungen von hervorragendem Interesse waren, daß die Autoren mit Sicherheit dieselbe Form als Grundlage zu ihren Untersuchungen gewählt haben. Es sind dies die Arbeiten von Zopf, Cienkowski, Büsgen, Höflich und Ellis. Von diesen haben Zopf und Cienkowski nicht mit Reinkulturen gearbeitet, Ellis, wie er angibt, nicht in allen Fällen. Von Interesse war für mich noch eine Arbeit Schikorras über Sphaerotilus fluitans n. sp., weil der Verfasser die Reinkultur dieses Organismus in derselben Weise wie ich gewonnen hat. Auf alle diese Arbeiten werde ich in den folgenden Ausführungen des öfteren zurückkommen.

Vorkommen.

Alle Angaben in der Literatur über das Vorkommen von Cladothrix an natürlichen Standorten stimmen darin überein. daß die Lebensbedingungen für Cladothrix gegeben sind durch einen mehr oder weniger reichlichen Gehalt des Wassers an organischen Bestandteilen, besonders stickstoffhaltigen Verbindungen (vgl. hierzu die Angaben von Cohn, Zopf u. a., besonders aber Kolkwitz). Nach Kolkwitz gehört Cladothrix zu den β-mesosaproben Formen. Sie bedarf also zu ihrer Lebenstätigkeit nicht der Eiweißstoffe, sondern kann ihren Bedarf an Stickstoff durch die Assimilation von organischen, stickstoffhaltigen Verbindungen vom Grade der Aminosäuren decken. Als besondere Kohlenstoffquellen können ihr neben Zuckerarten auch Glyzerin dienen. (Hierzu den physiol. Teil.) Die Erfahrungen, die ich beim Einsammeln des Materials gemacht habe, stimmen hiermit überein. Cladothrix dichotoma ist eine Bakterienform, die hinsichtlich der Menge des gebotenen Nährmaterials sehr genügsam ist. In Nährmedien, in denen es aus irgendeinem Grunde zur Entwicklung von anderen häufigen, fäulniserregenden Bakterienformen kommt, wird die Entwicklung der Cladothrix meist zurückgedrängt. In faulenden Algenkulturen sieht man die anfangs üppig wuchernde Cladothrix bald vollständig zurücktreten hinter anderen Organismen. An grünen, assimilierenden Ceratophyllum-Pflanzen konnte ich die Cladothrix-Fäden über einen Monat beobachten. Es scheint das letztere dadurch bedingt, daß in solchen Kulturen die nötige Versorgung mit Sauerstoff stattfindet, ein Faktor, der besonders an den natürlichen Standorten, wo Cladothrix den Kampf mit anderen Organismen aufzunehmen hat, von entscheidender Bedeutung ist. Fließendes Wasser ist daher der Entwicklung der Form außerordentlich zuträglich (über die Temperatur vgl. den physiol. Teil).

Gewinnung der Reinkultur.

Das Material für die Kulturen entstammte einem Graben, der sich in einer Breite von ungefähr 4 m neben der Machnower Schleuse (in der Nähe Berlins) hinzieht. Es ist ein Gewässer von ziemlich starkem Gefälle. Das Wasser ist verunreinigt durch organische Substanzen, die dem Ganzen selbst im durchfallenden Lichte ein trübes Aussehen geben. Das Material wurde im Juli gesammelt, einer Zeit, wo die am Rande reichlich wachsenden grünen Pflanzen in kräftiger Entwicklung standen. Von Protisten wucherten in dem Wasser außerordentlich stark Vorticellen, die einzelne Blätter mit einem dichten Filz von grauer Farbe überzogen hatten. Der Temperatur und den sonstigen biologischen Verhältnissen des Wassers entsprechend zeigte Cladothrix hier nur geringe Entwicklung. Von diesen Blättern wurden einige herausgefischt, auf das Vorhandensein von Cladothrix untersucht und in eine ½‰ starke Fleischextraktlösung gebracht (nach Büsgen und Höflich). Bei den ersten (mißlungenen) Versuchen verwandte ich Gläser von etwa ¼ l Inhalt, die nur lose mit Glasplatten bedeckt wurden. Später wählte ich hohe Glaszylinder von 1½—2 l Inhalt, die mit einem Deckel fest verschlossen werden konnten. Die Gläser wurden z. T. bei Tageslicht und z. T. in einem dunklen Schranke aufbewahrt. Schon nach einem Tage waren die Vorticellen abgestorben, und nach 2—3 Tagen sah man beim Bewegen des Glases, auf den Blättern befestigt, Büschel von Cladothrix flottieren. Im Gegensatz zu Büsgen und Höflich wartete ich nicht die Schwärmerbildung ab, sondern machte mit einer Pinzette die Büschel von den Blättern los und brachte sie nach gründlichem Auswaschen in frischem Leitungswasser in neue Nährlösungen. Das Ansetzen der Schwärmer an die Gefäßwand abzuwarten, fand ich deshalb nicht praktisch, weil sich mit den Schwärmern auch allerlei Verunreinigungen an den Wänden absetzen, die nicht, wie es Büsgen und Höflich bei ihren Versuchen gelang, durch häufiges Auffüllen der Gläser zu entfernen waren. Es tritt in solchen Gefäßen eine schnelle Trübung der Flüssigkeit ein und damit auch eine Verunreinigung der frei schwimmenden Flocken. Um recht viele frei schwimmende Flocken zu erzielen, ist es vorteilhaft, die mit einer einzigen Flocke beschickten Gefäße tüchtig zu schütteln. Es reißen dadurch von den Fäden einzelne Teilchen ab, und schon am folgenden Tage findet man eine größere Anzahl neuer Flocken vor. Es sind eben die abgerissenen Teilchen die Bildungszentren neuer Flocken geworden. Es ist nutzlos, solche Flocken, die unter dem Mikroskop relativ rein erscheinen, etwa in sterilisiertes Wasser oder Nährlösung zu übertragen. Immer wurde Cladothrix hier von anderen Bakterien vollkommen überwuchert. Auch alle Versuche, solche Flocken in flüssiger Gelatine zu verteilen und in eine Platte zu gießen, schlugen fehl. Immer trat eine frühzeitige Verflüssigung des Substrats ein. Nachdem durch häufiges Übertragen der einzelnen Flocken in frische Nährlösungen die Flocken als genügend rein anzusehen waren, wurden sie auf einer Gelatineplatte ausgestrichen. Diese bestand nach den Angaben von Büsgen und Höflich aus 45 g Gelatine auf 1000 ccm Wasser, versetzt mit ½ g Fleischextrakt; die Versuche, auf diesem Wege eine Reinkultur zu erzielen, hatten ein negatives Resultat. Da bei der relativ hohen Temperatur, die in den Monaten Juni und Juli herrschte, die Gelatine nur äußerst langsam erstarrte und immer von sehr weicher Konsistenz war, so wurden die Versuche mit einer Gelatine von 50 : 1000 und 75 : 1000 wiederholt, doch auch hier zeigte sich kein Erfolg. Zwar konnte häufig ein Anwachsen der Cladothrix festgestellt werden, aber immer wurde die Gelatine durch andere Organismen frühzeitig verflüssigt, so daß die Platten unbrauchbar wurden. Schließlich wurde, entgegen den Angaben Höflichs, der auf 1½-proz. Agar-Agar, versetzt mit ½‰ Fleischextrakt, kein Wachstum von Cladothrix erzielen konnte, ein Agar von 1 : 100 mit ½‰ Fleischextrakt versucht. Auch hier trat schon nach einem Tag ein Wachstum der Verunreinigungen ein, aber es hörte bald auf, wenigstens in den meisten Fällen, und vor allem trat natürlich keine Verflüssigung des Substrats ein. Bald machte sich nun ein Wachstum von Cladothrix bemerkbar. Sie wuchs gewissermaßen aus dem Hof der Verunreinigungen heraus und zwar derart weit, daß sie, ohne Gefahr die Verunreinigung zu berühren, abgeimpft werden konnte. (Von Erfolg war hier das Abimpfen mit feinen Kapillaren.) Das so gewonnene Material wurde nun auf Agar- und Gelatineplatten weitergezüchtet, gewöhnlich jedoch in kleinen Kolben von 150 ccm Inhalt, die 100 ccm 0,05-proz. Fleischextraktlösung enthielten, aufbewahrt.

Die Versuche wurden dann auf etwa 2 Monate unterbrochen. Das Material wurde in Reagensröhrchen, die mit Agar oder Gelatine und Fleischextrakt beschickt und mit Paraffin luftdicht verschlossen waren, aufbewahrt. Als nach dieser Zeit etwas von dem so aufbewahrten, reinen Material in eine sterile Fleischextraktlösung übertragen wurde, zeigte sich, daß die Kulturen diese lange Periode ohne jeglichen neuen Sauerstoffzutritt gut überstanden hatten. Doch wuchs es in der Lösung erst nach 6—8 Tagen an.

Im Laufe der Untersuchungen wurde die Reinheit des Materials oft durch Verteilen einer Flocke in einer Gelatine- + Fleischextraktlösung geprüft.

Eine zweite Reinkultur wurde von Material gewonnen, das unter wesentlich anderen Bedingungen gewachsen war. Ich gewann es leicht, indem ich in einem mit Leitungswasser gefüllten Glase einen Moosrasen, vollkommen untergetaucht, einige Tage stehen ließ. Etwa am dritten Tage bemerkt man an einzelnen Moospflänzchen einen dichten Überzug von Cladothrixfäden. Diese Form zeigte gegenüber der ersten keinerlei abweichende Merkmale.

Allgemeiner Habitus und Gewinnung einer Einfadenkultur.

Der Habitus der Cladothrix dichotoma ist in allen größeren bakteriologischen Werken hinreichend beschrieben, so daß ich hier von einer nochmaligen genauen Beschreibung absehen möchte. Nur einige ergänzende Beobachtungen will ich anführen. Impft man eine sterile Fleischextraktlösung mit einer Flocke von einer reinen Cladothrix-Kultur, so kann man schon am folgenden Tage eine reichliche Vermehrung beobachten, wenn man die Kultur bei etwa 25° aufbewahrt. Untersucht man solche frisch herangewachsenen Fäden mikroskopisch, so erblickt man ein vollkommen einheitliches Fadengeflecht, in dem jeder Faden etwa eine Breite von kaum 2½ μ besitzt (die Scheide nicht mitgerechnet).

Auffällig ist die Tatsache, daß schon nach wenigen Tagen der einheitliche Charakter der Kultur verloren gegangen ist. Es sind jetzt deutliche Unterschiede in der Breite der einzelnen Fäden aufgetreten, und zwar schwankt der Durchmesser zwischen 2 μ und 1 μ. Diese Tatsache ließ die Vermutung aufkommen, daß ich nicht eine absolute Reinkultur gewonnen hatte, sondern daß vielleicht eine Mischkultur verschiedener Spezies vorlag, die durch die Differenz in der Breite der Fäden unterschieden waren. Um dies zu entscheiden, wurde nach dem Burrischen Tuschepunkt-Verfahren eine Einzellkultur gewonnen. Zu diesem Zwecke wurde eine Flocke in gewöhnlicher, käuflicher (Günther-Wagner) Tusche 1 : 10, die vorher sterilisiert worden war, mit ausgeglühtem Platindraht stark zerzaust und dann die Punkte auf der Gelatineplatte (75 g Gelatine: 1000 H_2O—0,5 g Fleischextrakt) angebracht. (Die für das Wachstum von Cladothrix zuträglichere Gelatine von 45—50 g auf 1000 g H_2O erwies sich wegen ihrer geringen Konsistenz als unbrauchbar.)

Unter dem aufgelegten Deckglase wurden die einzelnen Fadenstücke genau kontrolliert. Als Ausgangspunkt wurde ein solcher Tuschepunkt gewählt, der ein einziges, vollkommen einheitliches Fadenstück enthielt. Es wurde genau darauf geachtet, daß kein Schwärmer seitlich anhaftete, und daß auch sonst kein Schwärmer in dem betreffenden Tuschepunkt zu beobachten war. Unter mikroskopischer Kontrolle wuchs dann der isolierte Faden unter dem Deckglas in meist 3 Tagen zu einem Rasen heran, der bei genügender Entfernung der einzelnen Tuschepunkte ohne Gefahr der Berührung mit anderen Rasen abgeimpft werden konnte. Meist blieben die Rasen beim Abheben des Deckglases in der Gelatine stecken. Das Verfahren wurde dreimal ausgeführt. Die so gewonnene „Einfadenkultur" zeigte ebenfalls den charakteristischen Breitenunterschied in den einzelnen Fäden. Es steht also somit fest, daß der Querdurchmesser der verschiedenen Fäden von Cladothrix dichotoma einer erheblichen Variabilität unterliegt, und zwar schwankt er zwischen 2,5 und 1 μ. Im Zusammenhange mit dieser Tatsache sei hier hervorgehoben, daß trotz der geringen Breite einzelner Cladothrixfäden in Reinkulturen nie jene außerordentliche Feinheit der Fäden beobachtet wurde, wie sie die Leptothrix zeigt, welche man gewöhnlich in Cladothrixkulturen beobachtet, die natürlichen Standorten entnommen werden. Es kann diese Beobachtung als ein Argument gegen die Annahme Zopfs angeführt werden, der einen Übergang der „Leptothrixform“ in die „Cladothrixform“ konstruieren wollte.

Die vegetativen Zellen.

Die Größe der vegetativen Zellen schwankt außerordentlich mit den Ernährungsbedingungen und dem Entwicklungsstadium der einzelnen Fäden. Unter normalen Bedingungen sind die einzelnen Zellen etwa 2—2½ μ breit und etwa 3—5-mal so lang (vgl. vorigen Abschnitt). In Keimpflänzchen, die man dadurch erhält, daß man auf einer Kultur ein steriles Deckglas etwa 24 Stunden schwimmen läßt (vgl. folg. Abschnitt u. Abbild. 3) sind die ersten Zellen fast alle von gleicher Größe und von normaler Form. Da die Schwärmer, aus denen doch jene Keimpflänzchen hervorgegangen sind, außerordentliche Größenunterschiede zeigen, ist wohl anzunehmen, daß se nach dem Festheften an die Unterlage erst die normale Zellform „regenerieren“ und dann zur Teilung schreiten.

Interessant ist, daß man in einer Kultur, in der dem Organismus noch reichlich Nährmaterial zur Verfügung steht, und Stoffwechselprodukte noch nicht in schädigender Menge vorhanden sind, selbst bei starker Vergrößerung (Zeiss Ok. 12. Öl.-Im. 2 mm) keine Querwände an der Mehrzahl der Fäden erkennen kann. Man erblickt einheitliche Fäden und in diesen zahlreiche, stark lichtbrechende Kügelchen (Fett und Volutin, vgl. jenen Abschnitt). Kurze Fadenstücke sehen einer schwefelfreien Beggiatoa außerordentlich ähnlich, nur daß ihnen natürlich jede Beweglichkeit fehlt (vgl. Kolkwitz).

Die Zellteilung erfolgt immer in der Querrichtung. Man kann sie leicht beobachten, wenn man das Material in eine starke Jod-Jodkaliumlösung (A. Meyer, Prakt., Anhang) bringt. An einem einzigen Faden beobachtet man deutlich alle Übergänge von der Wandbildung an den Seiten der Zelle bis zur allmählichen Durchschnürung nach der Mitte zu.

Die Zellen, die anfangs eng aneinanderschließen, lassen bald deutliche Zwischenräume zwischen sich erkennen, besonders in älteren Kulturen. Diese Erscheinung findet wohl darin ihre Erklärung, daß die Scheide an der Spitze platzt, und die Spitzenzellen als Schwärmer austreten und so den nachdrängenden Zellen Raum geben. Querbalken, wie sie Ellis in seinen Kulturen beobachtet hat, und die dadurch entstehen sollen, daß sich „transverse bars of the same material as the sheath“ zwischen die Zellen schieben, habe ich nicht beobachten können. Zwischen vielen, schon vollkommen ausgewachsenen Zellen sieht man deutlich bei Färbung mit Methylenblau eine feine, protoplasmatische Verbindung erhalten (A. Meyer, Flora. Bd. 84. 1897, Taf. VI. Fig. 54).

An den Enden der Fäden wird die Zellteilung oft so lebhaft, daß die entstehenden Tochterzellen bedeutend unter die Länge der normalen Zellen herabsinken und fast isodiametrische Form annehmen. Es ist dies das be-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

reits von Zopf beschriebene „Kokkenstadium". In älteren Kulturen, in denen also keine normalen Ernährungsbedingungen mehr herrschen, treten oft abnorm gestaltete, besonders keulig angeschwollene Zellen auf. Es sind dies Involutionsformen, die keinerlei besonderes Interesse bieten. Büsgen hat in seinen Kulturen Ähnliches beobachtet und gibt davon auch einige Abbildungen (vgl. hierzu den Abschnitt über „Fortpflanzung").

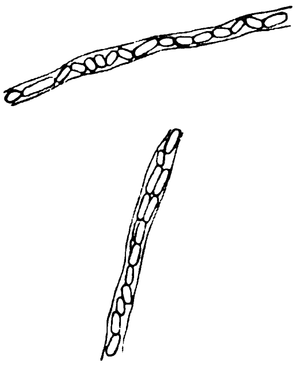


Fig. 1. Verlagerung der Zellen innerhalb der Scheide. Vergr. etwa 400 ×

Die normalen Zellen zeigen oft die Tendenz, eine Schräg- bis Querstellung gegen die Fadenrichtung einzunehmen, so daß oft merkwürdige Verschiebungen innerhalb der Scheide eintreten. (Man vgl. Fig. 1 und die Abbild. bei Zopf, Büsgen und Cienkowski.) Man erkennt deutlich, daß die Scheide dieser eigentümlichen Bewegung der Zellen Widerstand leistet, so daß es leicht dazu kommt, daß einzelne Zellen aneinander vorbeiwachsen und so mehrere Zellenreihen innerhalb derselben Scheide bilden. Eine Erklärung für die Tatsache der Verlagerung überhaupt könnte wohl darin zu suchen sein, daß in der Schrägstellung der Zellen der Beginn der Verzweigung liegt, und daß so weitgehende Verlagerungen nur dann vorkommen, wenn die Scheide aus unbekannten Ursachen nicht durchbrochen wird und keine Zweigbildung eintritt. Doch bleibt es unerklärlich, daß nur einige Fäden diese Verlagerung der Zellen zeigen und dann nicht nur auf kurze Strecken, sondern fast durch den ganzen Faden.

Über den Inhalt der vegetativen Zellen geben die meisten Autoren nichts Näheres an. Büsgen beobachtete in dem Protoplasma bei reichlicherer Ernährung stark lichtbrechende Tröpfchen. Cienkowski sah bei reicher Nahrungszufuhr eine so starke Aufspeicherung von Reservestoffkörnchen, daß sie die Membran der Zellen „ausstülpten, ihnen eine gekerbte Oberfläche verleihend". Nur Ellis macht genauere Angaben. Er hat neben Fett auch Glykogen als Reservestoff beobachtet, doch gibt er über die genauere Identifizierung beider durch Reagentien nichts an.

Meine eigenen Beobachtungen gehen dahin, daß unter normalen Bedingungen in den Zellen immer stark lichtbrechende Körnchen vorhanden sind, die durch Zusatz von Reagentien als Volutin oder teilweise auch als Fett erkannt wurden.

Volutin.

Nach den Angaben A. Meyers (Zelle der Bakterien. p. 238 ff.) wurde das Volutin durch folgende, für diesen Stoff charakteristische Reaktion nachgewiesen: Die Fäden wurden 3—5 Minuten in eine verdünnte Methylenblaulösung (1 : 10) gelegt und darauf mit 1-proz. Schwefelsäure differenziert. Das Volutin hob sich dann in Form tiefblau gefärbter, kugel- bis ovalförmiger Körperchen deutlich von dem vollkommen entfärbten Protoplasma ab. Zur genaueren Identifizierung wurde das Verhalten des Volutins gegen Fixierungs- und Lösungsmittel geprüft. Als „gelöst" wurde in folgendem das Volutin dann angesehen, wenn es sich nach der Methylenblau-Schwefelsäuremethode nicht mehr nachweisen ließ (vgl. Grimme, Centralbl. f. Bakt. Bd. 19). Das Material zu diesen Untersuchungen stammte immer aus Lö-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

sungen von $^1/_2\,^0/_{00}$ Gehalt an Fleischextrakt und war immer 24—48 Stunden alt.

Löslichkeit ohne vorherige Fixierung.

Kochendes Wasser löste das Volutin nach 1—2 Minuten. In Wasser von 80° in einigen Zellen bereits nach 5 Minuten, nach 10 Minuten in allen Zellen gelöst. In Wasser von 50° erst nach ½ Stunde vollständig gelöst (Zellen vorher 1—2 Minuten in 25-proz. Alkohol). Wurden die Zellen durch Liegen in 25-proz. Alkohol (1—2 Min.) abgetötet, so löste sich das Volutin in Wasser von Zimmertemperatur nach 24—48 Stunden vollständig. Ebenso in 1-proz. H_2SO_4 nach 24 Stunden, 5-proz. H_2SO_4 nach 5 Minuten, 5-proz. KOH und Na_2CO_3 löst das Volutin sofort.

1-proz. Na_2CO_3-Lösung bereits nach 1—2 Minuten (vorher abgetötet).

Beständiger ist das Volutin gegen Chloralhydrat, erst gelöst nach 5—10 Minuten langer Einwirkung.

Nach vorheriger Fixierung

in absolutem Alkohol (bis 24 Stunden), in Formol, Osmiumsäure (10 Minuten), konz. Pikrinsäurelösung (20 Minuten bis 1 Stunde), Flemmingscher Lösung (1 Stunde) wurde folgendes beobachtet: Nie wurde das Volutin derart fixiert, daß es unlöslich wurde in kochendem Wasser oder Wasser von Zimmertemperatur. Schwer löslich wurde es besonders nach Behandlung mit absolutem Alkohol, Flemmingschem Gemisch, doch löste es sich nach 5 Minuten langem Kochen oder nach 48 Stunden in Wasser von Zimmertemperatur. Ebensowenig wurde das Volutin fixiert durch schärferes Antrocknen an dem Deckglas, doch wurde es hierdurch schwerer löslich in kochendem Wasser.

Unlöslich war das Volutin

in Chloroform, Äther und Xylol.

Die vorstehenden Reaktionen decken sich im wesentlichen mit den Angaben A. Meyers und Grimmes bei ihren Untersuchungen über einige andere Bakterienspezies. Der Schluß ist wohl berechtigt, hier identische Stoffe anzunehmen.

Das Volutin war ein überaus typischer Bestandteil der Zellen und zwar auf allen Entwicklungsstadien; es fehlte keineswegs den Schwärmern; der Gehalt an Volutinkörnchen schwankte mit den Ernährungsbedingungen. Relativ große Körnchen traten in den Zellen auf, die in nitrathaltigen Lösungen wuchsen. Standen die Kulturen etwa 1—1½ Monate, so waren aus den Zellen fast alle Inhaltskörperchen verschwunden, bis auf ein einziges, stark lichtbrechendes Körnchen, das meist die Mitte der Zellen einnahm. Die Untersuchung lehrte, daß es sich ebenfalls um ein Volutinkörnchen handelte. Da über die chemische Natur und die Bedeutung des Volutins bisher noch keineswegs volle Klarheit herrscht, und die Meinungen der bakteriologischen Forscher noch weit auseinandergehen, so will ich hier kurz die Gründe anführen, die mich veranlaßten, in dem Volutin einen Reservestoffkörper zu sehen, in Übereinstimmung mit A. Meyer, der das Volutin zuerst als solches charakterisierte. Vor allem bestimmte mich hierzu die Periodizität im Auftreten der Volutinkörnchen, die vollkommen bestimmt wurde durch die Ernährungsbedingungen. Hierzu kommen die außerordentlichen Größenunterschiede zwischen den in einer Zelle befindlichen Körnchen und die Tatsache, daß bei reicher Nahrungszufuhr die Größe der Körnchen außer-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ordentlich zunahm. Schließlich sei hier vorausgenommen, daß ich glaube, neben dem Volutin chromatische Substanz nachgewiesen zu haben.

Fett.

Der Nachweis von Öltropfen gelang **Ellis** nur in Rohkulturen, in künstlichen Kulturen konnte er nie Fett nachweisen, wie er glaubt, waren die Bedingungen in künstlichen Kulturen der Ölbildung nicht günstig. Entgegen den Beobachtungen von **Ellis** konnte ich in allen von mir angesetzten, künstlichen Kulturen neben dem Volutin in den Zellen einen mehr oder minder reichlichen Gehalt an Fett beobachten. Der Nachweis gelang mit folgenden drei Reagentien:

Rotfärbung mit Sudan III (10 Min.)
Gelbfärbung mit Diamidoazobenzol } vgl. **A. Meyer**, Zelle der Bakterien. p. 227 ff.
Rotfärbung mit Alkanninlösung

Das Fett konnte durch Chloroform aus den Zellen extrahiert werden. Es ist diese Tatsache deshalb bemerkenswert, weil nach **A. Meyer** (Zelle d. Bakt. p. 287) die Extrahierung des fetten Öles durch Chloroform bei vielen Bakterienspezies nicht gelingt. Wie zu erwarten war, blieben dann die angeführten Fettreaktionen aus. An Stelle der Fettropfen sah man jetzt deutlich Vakuolen.

Der Gehalt an Fett war in Kulturen in ½ ‰ Fleischextrakt nach 24—48 Stunden sehr gering oder überhaupt nicht nachweisbar. Es trat dann bald eine erhebliche Steigerung im Fettgehalt auf, die nach einigen Tagen wieder allmählich zurückging. Oft nahmen die Öltropfen, besonders in Kulturen mit Gehalt an Zucker und Glyzerin, so an Größe zu, daß zwei oder drei von ihnen fast die ganze Zelle ausfüllten. Besonders schöne Bilder gaben Kulturen, die bei einer Temperatur von 30—35° C gewachsen waren. Nach 24 Stunden konnte man hier in den Zellen eine größere Zahl winziger Fetttröpfchen beobachten.

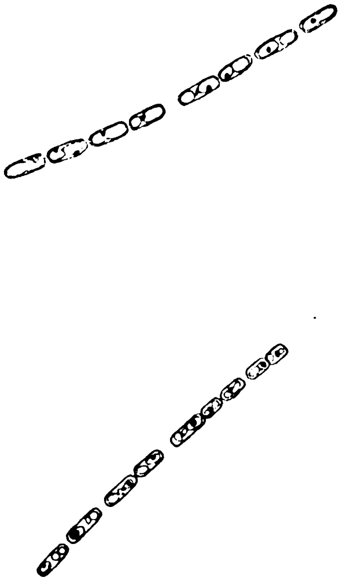


Fig. 2. Fett (helle Kreise) und Volutin (schwarze Kreise). Doppelfärbung.
Vergr. etwa 700 ×

Material von natürlichen Standorten zeigte ebenfalls Volutin und Fett in den Zellen.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß eine Doppelfärbung leicht durch folgende Behandlung gelang[1]). Das Material wurde 10 Minuten in der Sudanlösung gründlich durchgefärbt, darauf in Wasser abgespült, 3—5 Minuten mit Methylenblau gefärbt und differenziert wie oben. Es treten nach dieser Behandlung die rot gefärbten Fetttröpfchen deutlich neben den tiefblauen Volutinkörnchen hervor. Es gewinnt oft den Anschein, als ob die Volutinkörnchen im Fett eingebettet liegen (vgl. Abbildung 2).

Iogen und Glykogen.

Iogen konnte ich in den Zellen nicht nachweisen. Mit verdünnter Jodjodkaliumlösung trat keine Blaufärbung ein. Nach den Angaben **A. Meyers**

---

[1]) Diese Doppelfärbung wurde bereits von **Grimme** angewendet (vgl. **A. Meyer**, Praktikum, Abbild. im Anhang). An Stelle des Sudans verwandte er Diamidoazobenzol.

(Zelle d. Bakt. p. 210) lassen sich Iogen und Glykogen nur durch ihr Verhalten gegenüber starker Jod-Jodkaliumlösung auseinanderhalten. Doch ist bei der Anwendung dieses Reagens eine Vorsicht zu beachten. Da die Zellen von Cladothrix dichotoma Öl enthalten, so erhält man beim Zusatz der starken Jod-Lösung in den Zellen eine größere Anzahl rotbraun gefärbter Tröpfchen. Wie man sich leicht überzeugen kann, haben die Öltröpfchen diese Farbe angenommen. Extrahiert man das Öl vor der Behandlung mit der Jodkalium-Lösung, so kann man leicht beachten, daß jetzt nicht mehr rotbraun gefärbte Tröpfchen in den Zellen auftreten. Ein Beweis dafür, daß in der Tat die Öltropfen, die vorher in den Zellen waren, die rotbraune Färbung angenommen hatten, daß also Glykogen fehlt.

Untersuchung auf das Vorhandensein von Kernen.

Genauere Angaben über Kernuntersuchungen bei Cladothrix dichotoma bzw. Sphaerotilus natans fand ich nur bei A. Fischer (Vorlesungen üb. Bakterien. 2. Aufl. 1903. p. 7 f.) und bei Swellengrebel (Arch. f. Hyg. Bd. 70. 1909. p. 380). Die Abbildungen Fischers lassen in den einzelnen Zellen einige scharf hervortretende Körnchen erkennen, die einem farblosen Plasma eingelagert sind. Fischer sieht in diesen Körnchen keineswegs „echte“ Kerne. Ich möchte auf Grund der Abbildungen und Beschreibungen annehmen, daß diese Körnchen identisch sind mit Volutin. Weitgehender sind die Angaben Swellengrebels. Er geht von demselben Gesichtspunkte aus, der mich bei diesen Untersuchungen leitete. Ich sehe in dem Volutin einen Reservestoffkörper, der mit der echten chromatischen Substanz nichts zu tun hat, und es war mein Bestreben, neben dem Volutin Chromatinkörnchen oder vielleicht einen einzigen Kern nachzuweisen. Meine Erfahrungen bei diesen Untersuchungen waren die, daß es wegen der geringen Größe des Objektes unerläßlich ist, aus der Zelle, auch bei Anwendung sogen. spezifischer Chromatinfarbstoffe, alle übrigen Inhaltskörnchen, also hier Fett und Volutin, herauszulösen, natürlich ohne Schädigung der etwa vorhandenen chromatischen Substanz. Nur unter dieser Bedingung glaubte ich mich berechtigt, etwa übrig bleibende gefärbte Körnchen als Chromatin zu deuten (vgl. A. Meyer, Zelle der Bakterien). Swellengrebel hat diese Bedingung bei seinen Untersuchungen nicht erfüllt.

Das Material zu diesen Untersuchungen entnahm ich dem unten (s. u. Temperatur) angegebenen Standort. Es wurde fixiert mit einer Lösung von 10 g Sublimat, 100 ccm Alkohol, 100 ccm H_2O, 2 ccm Eisessig. Die Fixierungsflüssigkeit wurde zum Sieden erhitzt, das Material hineingeworfen und darin 1 Stunde unter allmählichem Erkalten der Lösung gelassen. Darauf wurde das Material durch häufiges Übertragen in frisches Leitungswasser etwa 6 Stunden lang ausgewaschen und danach noch etwa 12—14 Stunden in 25-proz. Alkohol liegen gelassen. Nach außerordentlich langsamer Überführung durch die verschiedenen Alkoholstufen, bis zu abs. Alkohol, wurde es noch 24 Stunden in Chloroform übertragen. Schließlich wurde das Material aus dem Alkohol in einem Gemisch von 1 Teil Alkohol abs., 1 Teil Glyzerin und 1 Teil Wasser für die weitere Behandlung mit Farbstoffen aufbewahrt (vgl. Sieben, Einführung in die botanische Mikrotechnik. Jena 1913). Diese Art der Fixierung in einer heißen, wässerigen Lösung hatte den Erfolg, daß die Volutinkörnchen vollkommen herausgelöst waren. In keiner der

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Zellen konnte ich nach der Methylenblau-Schwefelsäure-Methode Volutin nachweisen. Das Fett war durch die Behandlung mit Chloroform extrahiert worden. Neben dieser Fixierung wurden noch versucht solche mit schwachem Flemmingschen Gemisch und mit Osmiumsäure. Diese erwiesen sich als weniger geeignet, da es einige Schwierigkeit bereitet, das Volutin zu zerstören. Es gelingt zwar durch längeres Verweilen des Materials in heißem Wasser, doch treten hierbei immer weitgehende Deformierungen der Zellen ein.

Als Färbemittel erwies sich Eisen-Hämatoxylin als am meisten geeignet. Die Herstellung der Lösungen erfolgte genau nach der von Sieben (s. o.) angegebenen Vorschrift. Sowohl in der Alaun- wie in der Hämatoxylinlösung verblieben die Zellen je 24 Stunden. Differenziert wurde in der Weise, daß eine größere Anzahl von Flocken gleichzeitig in der Alaunlösung lagen. Nach etwa 2 Minuten wurde die erste Flocke herausgenommen, etwa ¼—½ Minute später eine zweite usf., bis etwa nach 5—6 Minuten die letzte der Flocken herausgenommen wurde. Ich erhielt so alle Übergangsstadien von solchen Fäden, bei denen die Differenzierung eben begann und solchen, die schon vollkommen farblos waren. Eine schöne Kontrolle für die richtige Wirksamkeit des Farbstoffes bestand darin, daß mit den Cladothrixfäden einige Infusorien, viele Diatomeen und der in Abwässern häufig auftretende Pilz Leptomitus mit fixiert und gefärbt worden waren. Auch an diesen Objekten beobachtete man deutlich alle Übergangsstadien von eben beginnender bis zu weit vorgeschrittener Differenzierung. In allen trat der Kern immer deutlich hervor, eine Tatsache, die für die vorliegenden Untersuchungen von Bedeutung war.

Die Cladothrixzellen boten folgendes Bild. In einem vakuolären Protoplasma, das oft bis zur völligen Farblosigkeit differenziert war, konnte man deutlich eine größere Anzahl distinkter Körnchen (5—8) unterscheiden. Ein einziger Kern war jedenfalls nicht nachweisbar. Besonders klare Bilder erhielt ich, wenn das Material vor dem Übertragen in Kanadabalsam etwa 24 Stunden in Nelkenöl verblieb (vgl. darüber die Angaben bei Sieben). Die Körnchen lagen meist zu mehreren hintereinander an den Seitenwänden der Zellen, doch traten auch Unregelmäßigkeiten auf, so daß einzelne Körnchen mitten in der Zelle zu liegen kamen. Gegenüberliegende Körnchenreihen standen durch feine protoplasmatische Fäden in Verbindung. Besonders auffällig war in einzelnen Zellen die Ausbildung von „hellen Kuppen" an den Polen der Zelle. Das Plasma war an diesen Stellen vollkommen homogen und zeichnete sich gegenüber den anderen Teilen der Zelle durch stärkere Lichtbrechung aus. Körnchen wurden in diesen Kuppen nicht beobachtet. Ähnliches gibt schon Bütschli für andere Bakterien an. Fischer sieht in diesen hellen Enden aber nur Kunstprodukte, die durch Plasmolyse entstanden sind (Fischer, Cyanophyceen und Bakterien. Jena 1897). Meine Beobachtungen bestätigen aber die Angaben Bütschlis, daß kein Kunstprodukt vorliegt.

Ein Vergleich dieser Bilder mit den Abbildungen, die einige neuere Autoren über Kernuntersuchungen bei Bakterien veröffentlicht haben, ergab eine besonders gute Übereinstimmung mit den Befunden Guillermonds. Guillermond bildet (z. B. Bacillus mycoides) eine Anzahl von Chromatinkörnchen ab, die in einem vakuolären Protoplasma eingebettet sind. Diese Körnchen liegen auch hier vorzugsweise an den Seitenwänden der Zellen und stehen durch feine protoplasmatische Brücken in Verbindung.

Eine ähnliche Übereinstimmung zeigten die Abbildungen Swellengrebels über seine Kernuntersuchungen bei Spirillen, doch mit dem Unterschiede, daß die Chromatinkörnchen weniger deutlich, die Protoplasmalamellen um so deutlicher hervortreten (Guillermond, Ref. im Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 450 und Swellengrebel, Arch. f. Hyg. Bd. 70). Die Deutungen, die beide Forscher ihren Befunden geben, weichen wesentlich voneinander ab. Während Guillermond eine Verteilung des Chromatins über die ganze Zelle annimmt und demzufolge von einem „Chromodialapparat" spricht, neigt Swellengrebel zu der Ansicht, daß ein spiralförmiger Einzelkern vorliegt, indem er die die Zellen quer durchsetzenden Lamellen mit zur Kernsubstanz rechnet. Diese Frage, ob ein Einzelkern oder Chromidialgerüst vorliegt, war auf Grund meiner Präparate nicht zu entscheiden, auch halte ich sie nach den bisher bekannten Tatsachen noch nicht für spruchreif. Etwaige Umlagerungen der Chromatinkörnchen habe ich nicht beobachten können. Swellengrebel hat besonders bei seinen (oben erwähnten) Untersuchungen über Sphaerotilus solche Umlagerungen der Kernsubstanz beobachtet und zwar oft in Beziehung zur Zellteilung. Seine Bilder entsprechen keineswegs den von mir beobachteten. Das Vorhandensein der Reservestoffe in den Zellen und das Antrocknen des Materials hat wahrscheinlich zu Täuschungen Anlaß gegeben.

Die Scheide.

Über die Natur der bei den verschiedensten Bakterienspezies so außerordentlich charakteristisch auftretenden Schleimschicht hat man bisher nur in einigen wenigen Fällen durch makrochemische Untersuchungen einige Aufklärung erhalten können (man vgl. die Zusammenstellung bei A. Meyer, Zelle der Bakterien. p. 141 ff.). Da über das Verhalten der Scheide von Cladothrix dichotoma gegenüber den gebräuchlichen chemischen Reagentien in der Literatur keine Angaben zu finden waren, gebe ich im folgenden eine Aufstellung dieser Reaktionen, ohne natürlich hieraus bestimmte Schlüsse auf die chemische Natur der Scheide zu ziehen.

Keine bestimmten Färbungen traten ein durch Behandlung mit Jodwasser, Jod-Jodkaliumlösung (auch in stärkerer Konzentration), Chlorzinkjod (nach der von Nowopokrowsky angegebenen Methode der getrennten Behandlung mit Jod-Jodkalium-Chlorzinklösung (Sonderabdr. aus d. Beiheft. z. Botan. Centralbl. Abt. I. Bd. 28. 1911). Ohne Erfolg war auch eine Kapselfärbung nach Ribbert (Migula. p. 60).

Eben so wenig wie durch diese Reagentien gelang Intensivfärbung mit Methylenblau, Methylviolett und Gentianaviolett. Besser glückt hier die Färbung nach scharfem Antrocknen der Präparate am Deckglas oder vorherigem Beizen mit Tanninlösung (vgl. Höflich).

Löslich war die Scheide in: konz. H_2SO_4 sofort, in 50 Proz. H_2SO_4 langsamer als die Membran der Zellen.

Unlöslich war die Scheide in: 5 Proz. H_2SO_4, Kalilauge bis 60 Proz., Kupferoxydammoniak.

Wurden die Scheiden etwa 15 Minuten in 60-proz. KOH auf 170° erhitzt, so war nach Bedandlung mit Jodjodkalium und darauffolgendem Auswaschen mit 1-proz. H_2SO_4 eine deutliche Blaufärbung der Scheiden zu beobachten. Eine schwächere Färbung trat ein durch Behandlung mit Chlorzinkjod, doch verquollen die Scheiden außerordentlich stark. Eine Violettfärbung, wie sie das Chitin von Krustaceenschalen in einem Parallelversuch zeigte, war jedenfalls nicht zu beobachten. (Viehoever hat neuerdings in den Membranen einiger Bakterienspezies Chitin nachweisen können.) Statt des Erhitzens auf 170° genügte auch ein einstündiges Kochen im Dampftopf oder mehrere Tage langes Stehenlassen bei Zimmertemperatur.

Die Membran der Zellen wurde bei solchen Versuchen zu weitgehend zerstört, als daß sich irgendwelche Färbungen mit Bestimmtheit erkennen ließen. Besser erhalten blieben die Membranen, wenn man die Zellen vorher scharf plasmolysierte und dann die Plasmolyse in absolutem Alkohol fixierte. Die so vom Plasma getrennten Membranen gaben mit Jodjodkalium und Chlorzinkjod keine Blaufärbung.

Die Ausbildung der Scheide erfolgt sehr frühzeitig. Schon auf dem Zweizellenstadium konnte ich sie mit Sicherheit erkennen (Fig. 3). Im übrigen schwankt der Querdurchmesser der Scheiden außerordentlich. In den Kulturen zeigten einige Fäden oft einen Querdurchmesser von 6 μ, wenn man die Scheiden mit einrechnete. Beobachtungen an ungefärbtem oder gefärbtem Material führen hier leicht zu Täuschungen. Wahrheitsgetreue Bilder erhält man, wenn man das Material in verdünnter Tusche liegend beobachtet. (Vielleicht erklären sich so die abweichenden Angaben Höflichs.)

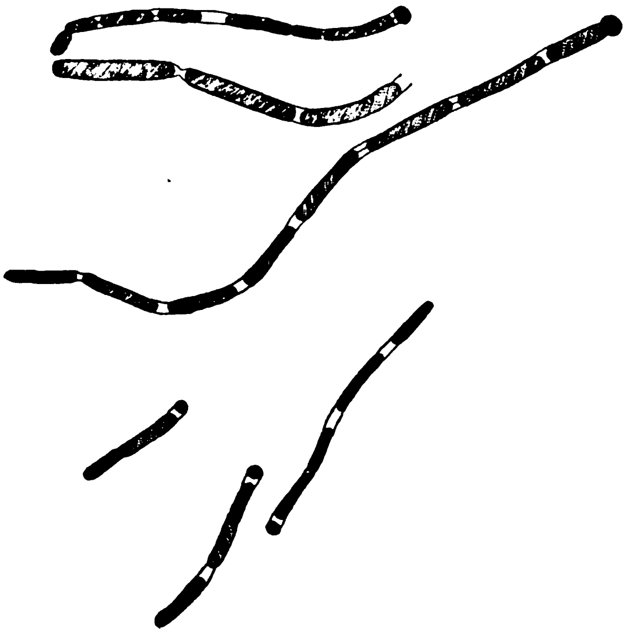


Fig. 3. Fäden in den ersten Stadien der Entwicklung aus Schwärmern. Vergr. etwa 550 bzw. 700 ×

Die Verzweigung.

In den Abbildungen, die in verschiedenen Werken von Cladothrix dichotoma gegeben werden und die besonders die falsche Dichotomie veranschaulichen sollen, kann man deutlich zwei Darstellungen der falschen Verzweigung auseinanderhalten. Einmal sieht man die Seitenzweige gewissermaßen dem Hauptstamm nur seitlich angeklebt, so daß Haupt- und Nebenast eine X-förmige Figur bilden, oft auch ohne Ausbildung eines unteren Astes an dem letzteren (s. Schema I und II in Abbild. 4). Eine zweite Darstellung zeigt dann eine direkte Aufteilung der Scheide mit fast gleicher Ausbildung von Haupt- und Seitenzweig (s. Schema III).

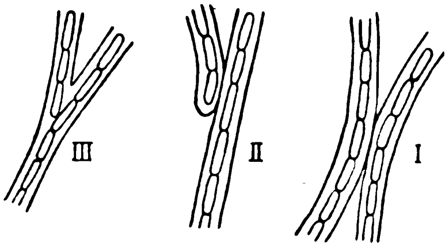


Fig. 4. Verzweigungsschemata.

Cohn hatte wohl die erste Art der Zweigbildung im Auge. wenn er sie dadurch entstanden erklärt, „daß ein Faden sich in der Mitte in eine untere und obere Hälfte durchfurcht; indem beide Hälften am Scheitel fortwachsen, verlängert sich die untere in unmittelbarer Fortsetzung neben der oberen, welche dadurch als scheinbarer Ast an die Seite gedrängt wird. Die X-Form entsteht, wenn die obere Hälfte an beiden Enden sich mehr oder weniger verlängert". Cienkowski will die erste Art der Verzweigung als „unechte" von der zweiten Art als „wahre" Verzweigung unterschieden wissen. Ellis macht darauf aufmerksam, daß die erste Art der „falschen" Verzweigung dadurch zustande kommt, daß sich Schwärmer an älteren Fäden festsetzen und dann zu „Seitenzweigen" auswachsen.

Seiner Beobachtung möchte ich beipflichten, da ich sie durch folgende noch wahrscheinlicher machen konnte. Hält man eine mit 2—3 Flocken geimpfte Nährlösung etwa bei 15°, so wachsen die Flocken stark heran, ohne daß, wie sonst, die Schwärmer sich an den Wänden festsetzen und neue Fadenbüschel bilden oder auch sonst die ganze Lösung mit neugebildeten Flöckchen anfüllen. Nimmt man nach einigen Tagen eine solche hineingeimpfte Flocke heraus, so beobachtet man unter dem Mikroskop, daß zwischen den einzelnen Fäden eine außerordentlich große Zahl von Schwärmern umherschwärmt. Die Erklärung dafür, daß die Schwärmer innerhalb des Bereichs des Fadengewirrs blieben und nicht in das umgebende Nährmedium ausschwärmten, liegt wohl darin, daß die niedrige Temperatur hemmend wirkte. Wenn aber eine so große Zahl von Schwärmern zwischen den Fäden verblieb, so war die Wahrscheinlichkeit des Anheftens an diese außerordentlich erhöht, und die erste Art der Verzweigung, nur eine Nachahmung der falschen Verzweigung, mußte besonders häufig zu beobachten sein. In der Tat bestätigte die Untersuchung diese Annahme.

Genauere Bilder von allen Phasen der falschen Verzweigung erhält man, wenn man die Flocken in sterilem Wasser zerteilt und dann nach Art der Geißelpräparate von diesem Material Präparate herstellt. Daß es leicht vorkommen kann, daß mehrere Zellen die Scheide durchbrechen und so mehrfache Verzweigungen auftreten, zeigt Fig. 5, die den Beginn einer trichotomen Verzweigung erkennen läßt.

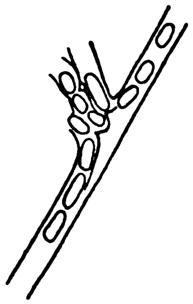


Fig. 5. Trichotome Verzweigung. Vergr. etwa 700 ×

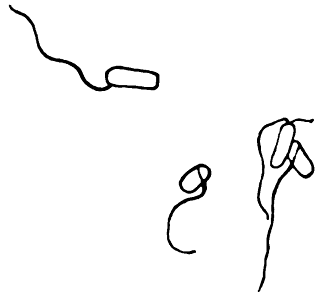
Fortpflanzung.

Die längst durch Zopf bekannt gewordene Fortpflanzung der Cladothrix dichotoma durch schwärmende Gonidien, glaubte Höflich dahin erweitern zu können, daß er in den ausschwärmenden Zellen selbst Sporenbildung beobachtete und diese Schwärmzellen als „Zoosporen" bezeichnete. Daneben beobachtete er auch Fortpflanzung durch „unbewegliche Gonidien".

Ellis hat nie irgendwelche Sporenbildung beobachten können, und ich möchte hier vorausschicken, daß auch in meinen Kulturen nie echte Sporenbildung auftrat. Auf Grund seiner sonstigen Beobachtungen kam Ellis zur Unterscheidung folgender fünf Arten der Fortpflanzung, durch:

a) Rod-shaped swarm cells,
b) Spirally-shaped swarm cells,
c) Rod-shaped swarm fragments,
d) Spirally-shaped swarm fragments,
e) Rod-shaped non motile fragments.

Die unter a aufgeführten Formen sind die bekannten schwärmenden Gonidien. Die unter c angeführten Formen sollen wohl nichts anderes bezeichnen, als Fadenstücke, die losgerissen, das Vermögen besitzen, wieder zu neuen Pflanzen auszuwachsen. Derartiges konnte ich leicht im Tuschepunkt beobachten. Die unter b angeführten Formen bezeichnen vielleicht Ketten von Schwärmern, die ich, bis zu fünf aneinandergereiht, durch das Substrat fortschwimmen sah. Auch glaube ich eine Kette beobachtet zu haben, an der nur ein Endglied durch aktive Bewegung die anderen Zellen nach sich zog. Dagegen habe ich eigenbewegliche Fadenstücke, wie sie etwa auch **Zopf** eingehend nach ihrem Zustandekommen beschreibt und polar begeißelt abbildet, nie beobachten können. Desgleichen traten spiralförmig gestaltete Zellen (b) und spiralförmige „bewegliche“ Fadenteile (d) nie in meinen Kulturen auf.



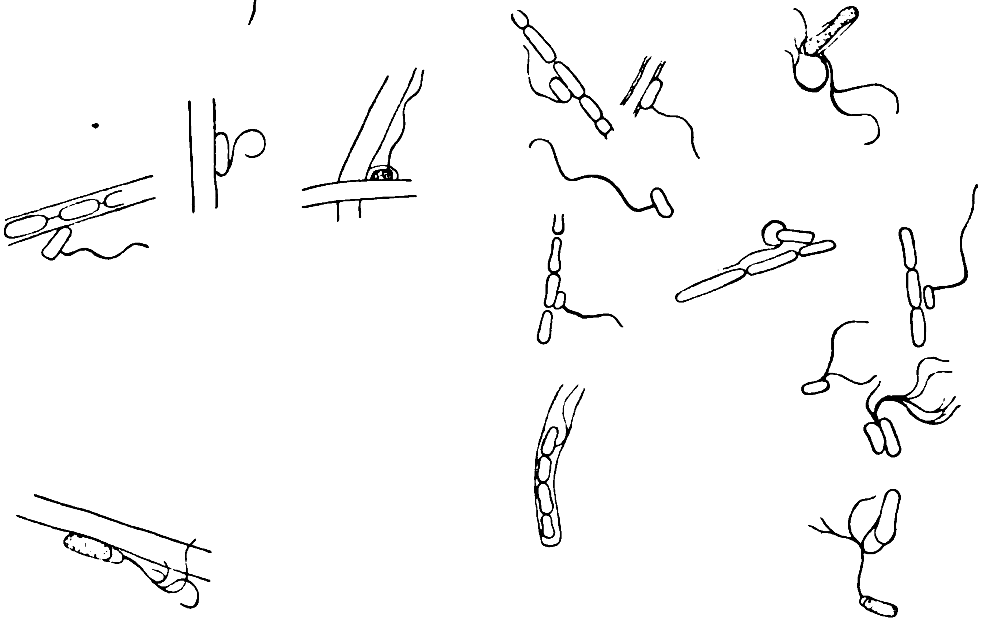


Fig. 6. Schwärmer. Vergr. etwa 700 ×

Die Angaben **A. Fischers**, daß die Schwärmer von **Cladothrix dichotoma** eine subpolare Begeißelung zeigen, wurde durch **Höflich** bestätigt. Die Geißelpräparate, die ich nach der genauen Vorschrift **A. Meyers**, Prakt. der botan. Bakterienk. p. 51, anfertigte, lieferten gute Bilder und entsprachen den Angaben der beiden Autoren vollkommen. In alkalisch reagierender Gelatine (s. w. u.) gelingt es leicht, große Kolonien von Schwärmern zu züchten. Hebt man diese mit der Gelatine heraus und beobachtet unter dem Deckglas die Schwärmer, die wegen der festen Konsistenz der Gelatine nur langsam rotieren können, so sieht man deutlich, daß schon Querteilungen in den Zellen aufgetreten sind.

Wie **Büsgen** und **Höflich** beobachteten, setzen sich die Schwärmer „mittels einer schleimigen Masse“ auf dem Substrat fest. Der Nachweis dieser Scheibe gelingt leicht, wenn man ein steriles Deckglas auf einer Nährlösung schwimmen läßt, nach 24—48 Stunden die anhaftenden Fäden schnell antrocknet und nach Art der Geißelpräparate beizt und färbt. Die erste Zelle des Fadens ist meist durch einen Zwischenraum von der Scheibe getrennt. Oft erkennt man zwischen der Scheibe und der ersten Zelle einen deutlich gefärbten Faden, nach Art der sonst zwischen den Zellen auftretenden Protoplasmaverbindungen (vgl. Abbild. 3).

Im Anschluß hieran möchte ich auf folgende Beobachtung hinweisen. Wenn man Reinkulturen von Cladothrix, am besten eigneten sich solche in Fleischextraktlösung, etwa 2 Monate bei Zimmertemperatur stehen läßt, so kann man bei mikroskopischer Untersuchung immer einzelne Zellgruppen bemerken, die sich gegenüber den anderen Zellen durch ihre Größe auszeichnen. Die Membran dieser Zellen ist dicker als die der gewöhnlichen Zellen, und darum erscheinen sie wohl von von homogenerem Inhalt, und bei der Färbung mit Methylenblau geht die darauffolgende Differenzierung mit 1 Proz. H_2SO_4 langsamer vor sich. In einer Kultur hatten diese Zellen eine ungewöhnliche Größe gegenüber den anderen Zellen angenommen. Sie zeigten das Bestreben sich abzurunden, doch kamen auch viele Formen vor, die man leicht als Involutionsformen bezeichnen konnte. Während aber fast alle anderen Zellen kein Volutin speicherten, also vielleicht abgestorben waren, zeigten gerade diese Zellen einen Gehalt an „Volutinkörnchen“. — Vielleicht hat man in diesen Zellen eine Anpassung des Organismus an ungünstigere Vegetationsbedingungen zu sehen (vgl. Abbild. 7).

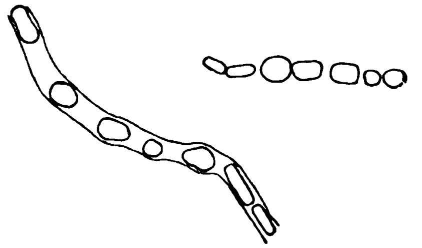


Fig. 7. Eigentümlich deformierte Zellen (Dauerzellen?) aus zwei Monate alten Kulturen. Vergr. etwa 600 ×

Physiologische Versuche.

Höflich hat das Wachstum von Cladothrix in verdünnter Fleischextraktlösung (1000 ccm Wasser, 0,5 g Fleischextrakt) und in Gelatine (40—50 g Gelatine gelöst in 1000 ccm Wasser, 0,5 g Fleischextrakt; die Reaktion soll schwach sauer oder neutral sein) eingehend untersucht und beschrieben, so daß ich auf seine Arbeit betreffs dieser beiden Punkte verweisen möchte, da ich seine Resultate bestätigt fand. Nur folgendes möchte ich noch besonders hervorheben. Bei meinen Versuchen geschah es anfangs, daß ich in Gelatine und Fleischextrakt kein oder nur geringes Anwachsen beobachtete. Die Untersuchung lehrte, daß die geringe Azidität des Nährsubstrats genügte, das Wachstum zu verhindern. Es ist also bei allen Kulturversuchen besonders auf die Reaktion des Nährbodens zu achten. Ein geringer Säuregehalt ist zwar für diesen Organismus erträglich, doch läßt sich der zuträgliche Grad nicht ohne weiteres erkennen, und man unterschätzt ihn leicht. Durch tropfenweisen Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung kann man die Alkaleszenz des Nährmediums ohne Gefahr so weit treiben, daß eine deutliche Blaufärbung von rotem Lackmuspapier eintritt, da Cladothrix einen ziemlich hohen Alkaligehalt verträgt. Die Konsistenz des Nährbodens ist nicht von so großem Einfluß, da ich noch 0,75—1-proz. Gelatine mit Erfolg verwendete.

Anders verhält es sich dagegen mit einer Reihe von Nährsubstraten, auf denen Höflich kein Wachstum von Cladothrix erzielen konnte. Er war zu dem Resultat gekommen, daß „Cladothrix dichotoma künstlich züchtbar ist in schwachen Bouillon- und dünnen Gelatinelösungen“,

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

alle Versuche auf anderen festen und in flüssigen Nährsubstraten fielen negativ aus. Es schien Cladothrix also außerordentlich wählerisch in bezug auf die Nährsubstrate zu sein.

Meine Versuche ergeben hier eine wesentliche Erweiterung. Zu den Versuchen wurden Erlenmeyerkolben von 150 ccm Inhalt verwandt, die mit 100 ccm Nährlösung beschickt wurden. Mit einem Wattebausch verschlossen, wurden die Lösungen eine Stunde im Dampftopf sterilisiert, dann während 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und danach nochmals eine Stunde sterilisiert. Anfangs wurden die Lösungen nach 24 Stunden, also nach gründlicher Sättigung mit Sauerstoff, geimpft, später zeigte sich jedoch, daß bereits nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur, also nach 2—3 Stunden geimpft werden konnte. Die Kolben wurden im Thermostaten bei 22°—25° C aufbewahrt. Immer wurden bei jeder Versuchsreihe Parallelversuche mit einer Fleischextraktlösung von ½‰, in der Cladothrix nachweislich wuchs, vorgenommen.

Als Ausgangsmaterial dienten in allen Fällen Kulturen in Fleischextraktlösung, die nie älter als 24—48 Stunden waren.

1. Lösungen von nicht genau kontrollierbarer Zusammensetzung[1]).

Diese Versuche bezogen sich auf Nährlösungen, die einen mehr oder weniger hohen Gehalt an organischen Verbindungen, besonders aber an Eiweißstoffen, enthielten.

1. a) 0,1 g Pepton auf 100 ccm Wasser;
   b) 0,5 g Pepton auf 100 ccm Wasser;
2. 0,5 g Nährstoff Haiden auf 100 ccm Wasser;
3. 500 g gehacktes Rindfleisch in 1 l Wasser gekocht und filtriert;
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch durch Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung;
4. Heuinfus, hellgelbe Lösung, vollkommen durchsichtig;
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch durch Na_2CO_3;
5. Heuinfus, kaffeebraune Lösung, kaum durchsichtig;
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch;
6. Fleischextrakt 0,5 Proz.
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch.

Die Lösungen 1 und 2 zeigten anfangs ein gutes Wachstum von Cladothrix, doch trat nach 2—3 Tagen ein vollkommener Stillstand ein.

In beiden Lösungen unter 3 trat ein kräftiges Wachstum ein, in der alkalischen ein wenig schneller und kräftiger. Beide Kulturen waren von auffallend schleimigem Aussehen. Die Lösungen unter 4 zeigten beide dasselbe kräftige Wachstum wie in Lösungen von Fleischextrakt. In 5 und 6 machte sich der Einfluß der Azidität geltend. In 5 a trat keinerlei Wachstum ein. In 6 a war die Entwicklung äußerst langsam und erst nach einem Monat deutlich bemerkbar, dann aber machte sie große Fortschritte. Die anfangs sauer reagierende Lösung war jetzt alkalisch geworden. Offenbar war der Säuregehalt der Lösung der Entwicklung des Organismus noch gerade zuträglich gewesen, und durch Ausscheidung irgendwelcher alkalisch reagierenden Stoffe war der Säuregehalt allmählich abgestumpft worden und schließlich einer alkalischen Reaktion gewichen. Das Wachstum in dem alkalisch reagierenden Heuaufguß war sehr kräftig. Die entstehenden Flocken waren außerordentlich groß und von schleimiger Konsistenz. Ausgesprochene Hautbildung war wie in allen vorhergehenden Fällen nicht zu beobachten. Dagegen zeigte die 1-proz. Fleischextraktlösung starke Deckenbildung. Die Verflechtung der Fäden war so stark, daß große Teile der Decke herausgehoben werden konnten.

---

[1]) Meyer, A., Praktikum der bot. Bakt. 5.

2. Lösungen von genau kontrollierbarer Zusammensetzung.

a) Stickstoff in Form organischer Verbindungen.

Als Stickstoffquelle diente in den ersten Versuchsreihen eine organische Verbindung von genau bekannter Zusammensetzung: Das Asparagin. Die nötigen Mineralstoffe wurden geboten durch eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung (vgl. Meyer, Praktikum d. botan. Bakterienk. p. 15).

1 g KH_2PO_4, 0,1 g $CaCl_2$, 0,3 $MgSO_4 + 7 H_2O$, 0,1 g NaCl, 0,01 g Fe_2Cl_6 gelöst in 1 l Wasser.

Die Reaktion dieser „mineralischen“ Nährlösung ist schwach sauer. Die Versuche mit dieser Nährlösung hatten alle ein negatives Ergebnis, selbst wenn das Asparagin durch Fleischextrakt ersetzt wurde. Die Untersuchung ergab, daß wiederum die geringe Azidität das Wachstum vollständig verhindert hatte. Denn wurde diese Lösung durch Zusatz von konz. Lösung von Na_2CO_3 alkalisch gemacht, so war in solchen Lösungen immer ein starkes Wachstum zu beobachten. Außerordentlich kräftiger war das Wachstum in solchen Lösungen, die neben dem Asparagin noch als besondere Kohlenstoffquelle Zusätze von Rohrzucker, Glukose und Glyzerin enthielten.

Da die Azidität der mineralischen Nährlösung hauptsächlich bedingt wird durch die saure Reaktion des KH_2PO_4 in wässriger Lösung, so wurde in der oben angeführten Lösung das KH_2PO_4 ersetzt durch K_2HPO_4, das Kaliumdiphosphat, das in wässriger Lösung eine alkalische Reaktion zeigt. Wie zu erwarten war, trat in der nun alkalisch reagierenden Nährlösung nach Zusatz von Asparagin ein kräftiges Wachstum auf.

Als vollkommen entbehrlich erwies sich bald der Zusatz von Fe_2Cl_6. In Lösungen, die selbst einen erheblichen Zusatz von Fe_2Cl_6 enthielten, zeigten die Scheiden nie Verfärbung durch Einlagerung von Eisenhydraten. Wenn man auch oft die Verfärbung der Scheiden durch Einlagerungen an Material von natürlichen Standorten beobachtet hat, so ist dies wohl auf rein mechanische Ursachen zurückzuführen und physiologisch von keiner Bedeutung.

b) Stickstoff in Form von anorganischen Salzen.

Da dieser Teil der Untersuchungen einen besonders wichtigen Beitrag zur Physiologie von Cladothrix dichotoma brachte, so sei hier nochmals die mineralische Nährlösung in ihrer veränderten Zusammensetzung, wie sie sich als Resultat der Untersuchungen unter II a ergab, angeführt:

Es wurden gelöst in 1000 Tl. dest. Wasser:

1 g K_2HPO_4, 0,3 g $MgSO_4 + 7 H_2O$, 0,1 g NaCl und 0,1 g $CaCl_2$.

Fügt man zu diesen mineralischen Salzen als Stickstoffquelle etwa 0,15 Proz. KNO_3 und als Kohlenstoffquelle etwa 0,2 Proz. Rohrzucker ($C_{12}H_{22}O_{11}$), so erhält man eine Nährlösung, die dem Wachstum von Cladothrix außerordentlich zuträglich ist. Die Menge der Cladothrix-Massen war in solchen Lösungen bedeutend stärker als in den üblichen Fleischextraktlösungen und den sonst unter 1 aufgeführten Nährlösungen mit Ausnahme etwa des starken Heuinfus und der starken Fleischextraktlösung. Charakteristisch gegenüber den Lösungen mit organischen Stickstoffquellen war, daß es nie zur Bildung einzelner, frei flottierender Flocken kam, sondern das Ganze bildete zusammenhängende, dichte Fadenmassen von schleimigem Aussehen.

An Stelle der Nitrate wurden Ammoniumsalze (NH_4Cl, $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$) mit gleichem Erfolge verwandt.

Als Vorlage bei der Herstellung der verschiedenen Nährlösungen diente die in A. Meyers „Praktikum der botan. Bakterienk. p. 24“ angeführte Tabelle. Doch mußten hier Abänderungen getroffen werden, da in diesen Lösungen mit einem Gehalt von 1 Proz. KNO_3 oder $(NH_4)Cl$ neben den mineralischen Salzen und den Kohlenhydraten kein Wachstum eintrat, da sie osmotisch so stark wirksam sind, daß die für diesen Organismus erträgliche Grenze, die nach Fischers Untersuchungen bereits bei 1,25 Proz. NaCl liegt, wohl bereits überschritten wird (vgl. A. Fischers Angaben über Plasmolyse der Bakterien). Als Kohlenstoffquelle erwiesen sich neben dem bereits erwähnten Rohrzucker noch folgende Stoffe als brauchbar:

1. Glyzerin, konz., 8 Tropfen auf 100 ccm Lösung.
2. Mannit, 2 Proz.
3. Die Hexosen: d-Glukose, besonders gut auch Galaktose.
4. Die Diosen: besonders gut Rohrzucker, weniger gut Laktose, geringes Wachstum wurde erzielt mit Maltose.

An höher molekularen Kohlenhydraten wurden versucht: Dextrin, Gummi arabicum, Weizen- und Reisstärke, Inulin und Zellulose. Die Versuche mit der letzten (5.) Gruppe hatten ein vollkommen negatives Ergebnis. Cladothrix dichotoma ist also nicht imstande, diese Gruppe der höher molekularen Kohlenhydrate abzubauen, und auch bereits unter den Diosen befinden sich Zuckerarten, die, wie dies für die Maltose zutrifft, von dem Organismus schwer assimiliert werden können.

3. Feste Substrate.

Über das Wachstum auf Gelatine vergleiche man die Angaben Höflichs. Um Cladothrix auf Agarplatten zu kultivieren, eignet sich am besten ein Agar von folgender Zusammensetzung: in 1 l Wasser werden 10 g Agar gelöst und mit ½ g Fleischextrakt versetzt. (Die meist schwach saure Reaktion des Nährbodens ist dem Wachstum nicht schädlich, doch wird durch alkalische Reaktion das Wachstum gefördert.) Da eine Verflüssigung des Substrats nicht eintritt, so kann man auf Agarplatten Rasen von größerem Umfange erzielen als auf Gelatineplatten. Sorgt man etwa durch Aufbewahren der Platten in einer feuchten Kammer dafür, daß kein Eintrocknen des Nährsubstrats eintritt, so kann man leicht Rasen von 10 cm Durchmesser erzielen. Der Fortschritt des Wachstums wird durch eine leichte Trübung des Mediums gekennzeichnet. Die Fäden dringen nicht tief in das Substrat ein. Ähnlich wie auf Gelatineplatten zeigen die Fäden oft spiralige Windungen mannigfaltigster Art, die wohl nicht allein durch die Konsistenz des Nährmediums bedingt werden, da sie auch in Wasserkulturen zahlreich auftreten. Besonders charakteristisch für das Wachstum auf Agarplatten ist das schneckenartige Aufwinden der Fäden auf der Oberfläche des Substrats. Es kommt oft vor, daß einzelne Fäden 3—4 konzentrische Kreise bilden.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Nach den Angaben Schikorras über die Kultur des Sphaerotilus fluitans benutzte ich auch folgenden Agar: Auf 1 l Wasser kamen 15 g Agar, 10 g Pepton, 10 g Fleischextrakt. Also ein Agar von viel festerer Konsistenz und reicherem Gehalt an Nährsalzen als der vorige. Das Wachstum, das hier beobachtet wurde, war ganz verschieden von dem auf dem vorigen Agar. Makroskopisch beobachtete man eine feste, undurchsichtige Decke von schmutzig weißem Aussehen, die außerordentlich langsam heranwuchs. Mikroskopisch zeigte sich, daß der Organismus streng auf der Oberfläche gewachsen war. Die einzelnen Fäden bildeten ein dichtes Geflecht von einzelnen zu Knäueln vereinigten Fäden. Sporenbildung, wie sie Schikorra bei seinen Untersuchungen sah, wurden auch an dieser Form nicht beobachtet, Fett und Volutin bildeten wieder die charakteristischen Inhaltsbestandteile (vgl. Schikorra).

Versuche, Cladothrix auf Kartoffelscheiben zu kultivieren, hatten keinen Erfolg.

Temperatur.

Höflich hat das Temperaturoptimum zwischen 25° und 30° C liegend bestimmt. Kolkwitz, der Cladothrix und Sphaerotilus identifiziert, gibt nach seinen Beobachtungen an natürlichen Standorten an, daß Sphaerotilus besonders gut bei niederen Temperaturen gedeiht, so daß z. B. bei 4° C die Reinigung der Abwässer durch Sphaerotilus noch lebhaft stattfindet. Eine ähnliche Angabe macht Schikorra über seinen Sphaerotilus fluitans dahingehend, daß noch bei 1° C eine üppige Vegetation des Pilzes zu beobachten ist. Meine eigenen, aus Reinkulturen gewonnenen Beobachtungen stimmen mit denen Höflichs überein, nur muß ich das Optimum auf 30°—35° C verlegen. Bei dieser Temperatur gedieh Cladothrix so üppig, daß man bereits nach 2—3 Stunden makroskopisch einen deutlichen Fortschritt in der Entwicklung beobachten konnte. Auch noch bei 37° war ein schwaches Wachstum ähnlich dem bei unter 20° zu beobachten. Das Maximum liegt zwischen 37° und 40° C, oberhalb 40° findet ein Wachstum nicht mehr statt.

Wachstumsversuche bei niedrigen Temperaturen gaben eine starke Abweichung von den Beobachtungen an natürlichen Standorten, vorausgesetzt, daß die Identität von Sphaerotilus und Cladothrix zutrifft. Unterhalb 10° konnte ich ein Wachstum der Kulturen nicht mehr beobachten. Vielleicht wird aber diese Abweichung bedingt durch die ganz anderen Verhältnisse in künstlichen Kulturen. Besonders macht sich hier wohl geltend der reiche Gehalt an Sauerstoff in fließenden Gewässern und wohl auch die schnelle Entfernung der Stoffwechselprodukte und die schnelle Zuführung frischen Nährungsmaterials.

Als Ergänzung hierzu möchte ich folgenden Befund angeben, der die Angaben von Kolkwitz vollkommen bestätigt. Im März dieses Jahres sammelte ich (in Johannisthal auf dem rechten Ufer der Spree, rechts neben der Treskowbrücke) Material von Sphaerotilus natans. Die Temperatur des Wassers betrug erst wenige Grade über 0, und gerade dieser Umstand hatte die Vegetation des Sphaerotilus derart begünstigt, daß ich hier dem Wasser große Rasen entnehmen konnte, die fast nur aus Sphaerotiluspflänzchen bestanden. In dem äußeren Habitus konnte ich keinen Unterschied zwischen dieser und der von mir beobachteten Form erkennen. Die Inhaltsbestandteile der einzelnen Zellen waren Fett und Volutin. Hin und wieder beobachtete ich, daß bis zu drei Fäden in einer gemeinsamen Scheide lagen (vgl. hierzu über „Pleomorphismus").

Titrierung des zuträglichen Säuregehalts.

Da Cladothrix besonders der Azidität der Nährlösung gegenüber eine so große Empfindlichkeit zeigte, und diese Frage auch für den Abwasserbiologen von einigem Interesse ist, habe ich versucht, den zuträglichen Säuregehalt durch Titrieren mit einer 1/10-normal Natronlauge zu bestimmen. Als Nährlösung diente folgende Zusammensetzung:

In 1 l Wasser wurden gelöst:

1 g HK_2PO_4, 0,3 g $MgSO_4 + 7 H_2O$, 0,1 g $CaCl_2$, 0,1 g NaCl und 2 g $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Rohrzucker), 1,5 g KNO_3.

Als Indikator diente Phenolphtaleïn. Der Umschlag war nicht sehr scharf.

Ein Gehalt von $^1/_{200}$-normal wurde noch gut ertragen, wenig darüber hinaus trat schon ein zögerndes, krankhaftes Wachstum auf. Vollkommen verhindert wurde das Wachstum durch einen Gehalt von $^1/_{140}$-normal H_2SO_4.

Letzteres entspricht etwa einem Tropfen konz. H_2SO_4 auf 150 ccm Lösung.

Sauerstoffbedürfnis.

In Übereinstimmung mit den Angaben Höflichs gelang es nicht, in Fleischextraktlösungen bei Luftabschluß Wachstum zu erzielen.

Eine andere Versuchsreihe zielte darauf ab, die Frage zu untersuchen, ob Cladothrix dichotoma wie vielen anderen Bakterien denitrifizierende Eigenschaften zukämen. Reagensröhrchen wurden etwa bis zu ¼ mit der oben angeführten nitrathaltigen Nährlösung gefüllt, und einige von ihnen nach der Buchnerschen Methode (Pyrogallussäure und Kalilauge) luftdicht verschlossen. In allen so abgeschlossenen Röhrchen war kein Wachstum zu beobachten, während in den anderen immer eine kräftige Entwicklung eintrat.

Cladothrix dichotoma ist also obligat aërob.

Pleomorphismus.

Die Angaben Zopfs über den Pleomorphismus von Cladothrix dichotoma konnten durch die Untersuchungen von Büsgen, Winogradsky und Höflich nicht bestätigt werden (vgl. Einleitung). Dagegen konnte Ellis die Beobachtungen Zopfs in weitgehender Weise unterstützen. Wenn er auch nicht alle die von Zopf angegebenen als in den Entwicklungsgang von Cladothrix gehörigen Formen beobachten konnte, so hat er doch unter anderem deutlich gesehen, wie sich von einem Cladothrixfaden eine typische Spirillenform loslöste, so daß er zu der festen Überzeugung kam, daß die von Zopf beschriebenen Spirillenformen in den Entwicklungsgang der Cladothrix dichotoma gehörten. Wie er angibt, wurden die Beobachtungen nicht in einer Reinkultur gemacht.

Die Untersuchungen, die ich bezüglich dieser Frage anstellte, zielten darauf ab, vor allem die folgenden beiden Punkte zur Entscheidung zu bringen. Durch Abänderung der Ernährungsbedingungen wollte ich einmal versuchen, ein Zoogloeastadium zu züchten. Wenn die Annahme Zopfs, daß die Zoogloea ramigera in den Entwicklungsgang der Cladothrix gehörte, wirklich den Tatsachen entsprach, so garantierte dies beinahe den Erfolg. Ebenso mußte es gelingen, die Sphaerotilus-Form zu erhalten. Für die letztere erwartete ich als Charakteristika besonders die Vereinigung vieler Fäden in einer gemeinsamen Scheide und eine weniger große Festigkeit der Scheide. Ein drittes Merkmal, ein größerer Abstand der einzelnen Zellen innerhalb der Scheide, kann wohl kaum in Betracht kommen, da solche Abstände in alten Kulturen immer auftreten (vgl. Migula).

Für die Zusammensetzung der verschiedenen Nährlösungen war natürlich die Bestimmung maßgebend, daß nicht etwa durch irgendwelche Stoffe eine ungünstige Beeinflussung der Kulturen stattfand und so krankhaft veränderte Formen gezüchtet wurden. Da nach den Angaben von Kolkwitz Sphaerotilus natans und die Zoogloea ramigera besonders in der polysaproben Zone auftreten, so war hier eine Abänderung in der Richtung gegeben, daß die Nährlösungen einen besonders hohen Gehalt an Eiweißstoffen aufwiesen. Es wurden daher besonders Fleischextraktlösungen in verschiedenen Konzentrationen versucht. In einer 1-proz. Lösung, die einen gelblichbraunen Farbenton zeigte und die schon einen Gehalt an Nährstoffen aufweist, wie er an natürlichen Standorten kaum noch vorkommen dürfte, trat (vgl. oben) ein typisches Deckenwachstum auf. Irgendwelche besonderen Formen konnten aber nicht beobachtet werden.

Eine eigentümliche Beobachtung beim Wachsen der Form auf Gelatineplatten legte eine Abänderung in einer noch anderen Richtung nahe. Wenn man nämlich die Alkaleszenz der Gelatine durch tropfenweisen Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung erheblich weit treibt, so beobachtet man folgende Eigentümlichkeit. Impft man die Gelatineplatte etwa in der Mitte mit einer Cladothrix-Flocke, so ist am folgenden Tage ein beträchtliches Wachstum der Fäden festzustellen. Im Umkreis der angewachsenen Flocke und oft in keiner Verbindung mit den Fäden, erkennt man bald einzelne kleine Kolonien. Sie sind meist von nahezu kugelförmiger Gestalt, doch auch oft außerordentlich unregelmäßig geformt. Ja, Bilder, wie man sie von den lappenförmigen Verzweigungen der Zoogloea ramigera gewohnt ist, sind nicht selten. Auf den ersten Blick glaubt man, Verunreinigungen vor sich zu haben, doch die mikroskopische Untersuchung lehrt, daß es sich um Anhäufungen von Schwärmern handelt. Oft hat es auch den Anschein, als ob einige Fäden direkt in diese Zoogloea-Formen aufgehen.

Der Gedanke lag nahe zu versuchen, diese Wuchsform auch in flüssigen Nährmedien hervorzurufen. In der Tat könnte ja auch die alkalische Reaktion des Wassers diese Art des Wachstums an natürlichen Standorten veranlassen. Die Alkaleszenz der Nährlösungen wurde durch Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung allmählich gesteigert. Diese Steigerung wurde schließlich so weit getrieben, daß das Wachstum vollkommen verhindert wurde. Wiederum trat in keiner der verschiedenen Kulturen eine besondere Wuchsform auf. Die Erklärung des sonderbaren Wachstums in der Gelatine ist wohl somit allein in der festeren Konsistenz dieser zu suchen. Wurden solche Schwärmermassen in der Gelatine haftend untersucht, so genügte ein geringer Druck auf das Deckglas, um die Schwärmer zu zerstreuen, ein Beweis dafür, daß sie allein durch die Festigkeit der Gelatine zusammengehalten wurden. Im Gegensatz hierzu sind die Zellen der Zoogloea ramigera von einem zähen Schleim umhüllt, der ein schnelles Zerfallen unmöglich macht.

Das völlig negative Resultat dieser Untersuchungen kann natürlich nicht als Beweis dafür gelten, daß die Zusammengehörigkeit der Zoogloea ramigera und der Cladothrix dichotoma nicht bestehe; immerhin wird sie hierdurch außerordentlich unwahrscheinlich gemacht.

Es sei hier nochmals betont, daß auch in diesen Kulturen keine echten Spirillen auftraten, die Beobachtungen von Ellis also nicht bestätigt werden konnten.

Über Sphaerotilus natans standen mir an Literatur und Abbildungen in der Hauptsache die Angaben von Kolkwitz zur Verfügung (vergl. auch „Zur Lebensgeschichte von Sphaerotilus natans", Separatabdr. a. d. Zeitschr. d. Ver. f. Deutsch. Zuckerind. Bd. 62. 1912. H. 680). Abgesehen von der großen Differenz in der Lage des Temperaturoptimums, konnte ich einen Unterschied zwischen beiden Formen nicht erkennen. Daß sich diese Abweichungen vielleicht durch die veränderten physiologischen Bedingungen in künstlichen Kulturen erklären, wurde schon oben erwähnt. Die besonders bei Migula und im „Lafar" angeführten Unterscheidungsmerkmale des Sphaerotilus gegenüber Cladothrix, das Wachstum mehrerer Zellreihen in einer gemeinsamen Scheide und die zarte und schleimige Konsistenz der letzteren, scheinen mir vollkommen relativ und nur bedingt durch biologische Verhältnisse. Bei genauer Untersuchung fand ich oft an meinem Material bis zu drei Zellreihen in gemeinsamer Scheide liegend und diese selbst zeigte in ein und derselben Kultur alle Übergänge von äußerst zarter Konsistenz bis zu großer Festigkeit bei einer Gesamtbreite des Fadens von 6 µ. In Übereinstimmung mit dieser Annahme steht auch die Tatsache, daß bei reicher Nahrungszufuhr schon makroskopisch der Habitus der Cladothrix-Büschel ein schleimiges, zottiges Aussehen annimmt, wie dies charakteristisch ist für Sphaerotilus natans (man vgl. vor allem die Abbild. bei Kolkwitz in „Lafar". Bd. 3. Taf. X).

Bemerken möchte ich noch, daß außer Kolkwitz auch Ellis auf Grund eigener Beobachtungen und der Angaben in der Literatur der Überzeugung Ausdruck gibt, daß Sphaerotilus natans und Cladothrix dichotoma identische Organismen sind.

Endlich soll hier noch kurz die Verwandtschaft der Cladothrix zu anderen Bakterien charakterisiert werden. In neuerer Zeit sind nämlich gegen die Stellung der Cladothrix dichotoma im System von einigen Forschern Einwände erhoben worden. Auf Grund der Morphologie und der Entwicklungsgeschichte bestreiten sie die Zugehörigkeit der Cladothrix zu den echten Bakterien und wollen überhaupt die ganze Gruppe der „Chlamydobakterien" von den „Bakterien" trennen. So „schaltet" Miehe die Gruppe „der echten Fadenbakterien" ganz aus dem System aus (Handwörterb. d. Naturwissenschaft. Bd. 1. p. 875). A. Meyer schreibt über die Fadenbakterien: „Die meisten Spezies besitzen Außenmembranen, in denen die Oidien verschiebbar sind. Mir scheinen sie doch wesentlich verschieden von den Organismen zu sein, die ich als Eubakterien zusammenfassen möchte" (Zelle d. Bakt. p. 1). Demgegenüber möchte ich betonen, daß ich auf Grund meiner Untersuchungen mich von der so

„wesentlichen“ Verschiedenheit der Eubakterien und der Cladothrix dichotoma nicht überzeugen konnte, vielmehr scheint mir eine weitgehende Übereinstimmung beider Gruppen in den Hauptmerkmalen zu bestehen, so daß die althergebrachte Ansicht, daß die Fadenbakterien eine Gruppe hochentwickelter Bakterienformen darstellen und mit diesen in ein System zu stellen sind, immer noch berechtigt scheint. Diese Ansicht stützt sich einmal auf die Morphologie und Organisation der Zellen. Wie ich schon oben bemerkte, sind aus der Gruppe der „Eubakterien“ viele Formen beschrieben, deren Zellstruktur mit der von Cladothrix gut übereinstimmt, vor allem die Gestalt und Lagerung der Chromatinkörnchen und die Ausbildung von Kuppen an den Polen. Die Reservestoffe sind dieselben wie sie auch bei „Eubakterien“ angetroffen werden (etwa bei Spirillum volutans). Ferner kommt in Betracht die Form und der Ansatz der Geißeln (vgl. besonders Spirillum sputigenum). Hier läßt sich nicht bestreiten, daß sie denen der Spirillen weitgehend ähneln.

Die wichtigsten Ergebnisse meiner Untersuchungen über die Morphologie und Physiologie von Cladothrix dichotoma lassen sich in folgenden Sätzen kurz zusammenfassen:

Morphologie.

1. Ein einzelner Kern war in den Cladothrixzellen nicht nachzuweisen, statt dessen traten an entsprechend fixiertem und gefärbtem Material „Chromatinkörnchen“ auf, die von den in der Zelle vorhandenen Reservestoffkörnchen scharf unterschieden waren. An den Polen der Zellen waren homogene, körnchenfreie Protoplasmakuppen ausgebildet. — An Reservestoffkörnchen waren vorhanden Volutin und Fett, wie sie auch sonst bei echten Bakterien, z. B. Spirillum volutans, angetroffen werden. Form und Ansatz der Geißeln glichen ebenso denen der echten Spirillen. Es liegt somit keine Veranlassung vor, Cladothrix dichotoma von den Eubakterien (A. Meyer) oder Haplobakterien (A. Fischer) abzutrennen, vielmehr besteht die alte Anschauung, die in den Fadenbakterien hochentwickelte, echte Bakterien sieht, zu Recht.

2. In der äußeren Morphologie der Zellen, ihrer Form und Größe, dem Zusammentritt der einzelnen Zellen zu einem Fadenverbande, der Breite der Scheide, der pseudodichotomen Verzweigung, der Entstehung der Schwärmer und ihrem Auswachsen zu neuen Fäden, konnten im wesentlichen die Angaben früherer Autoren bestätigt werden. (Einzelheiten sind aus der Arbeit zu ersehen.)

3. Die Angaben Ellis' über das Auftreten von echten Spirillen im Entwicklungsgang der Cladothrix dichotoma konnten nicht bestätigt werden. Die Ansicht einiger Autoren, daß die Zoogloea ramigera, eine Bakterienform, die in faulendem Wasser häufig mit Cladothrix dichotoma vereint auftritt, in den Entwicklungsgang von Cladothrix dichotoma gehört, konnte nicht wahrscheinlich gemacht werden. Einige Beobachtungen über das Wachstum von Cladothrixschwärmern in zoogloeaartigen Verbänden er-

gaben auch keine Anhaltspunkte dafür, daß der genetische Zusammenhang beider Formen besteht. In Übereinstimmung mit anderen Autoren bin ich zu der Überzeugung gekommen, daß die in der Literatur als Cladothrix dichotoma Cohn und Sphaerotilus natans Kuetzing beschriebenen Organismen identisch sind.

Physiologie.

1. Die Untersuchungen über die Physiologie von Cladothrix dichotoma wurden sämtlich in Reinkulturen vorgenommen. Die Reinkultur von Cladothrix dichotoma gelingt leicht auf Agar, der mit $^1/_{20}$ Proz. Fleischextrakt versetzt wird und schwach alkalische Reaktion zeigt. Die Abwässerbiologen stellen Cladothrix zu den β-mesosaproben Formen, sie soll somit ihren Bedarf an Kohlenstoff und Stickstoff durch die Assimilation von organischen Verbindungen decken. Versuche in Reinkultur ergaben, daß als Kohlenstoffquelle folgende Stoffe dienen können: Eiweißstoffe und ihre Abbauprodukte, wie Peptone und Aminosäuren; an stickstoffreien Verbindungen: Glyzerin, sechswertige Alkohole (Mannit), besonders Mono- und Disaccharide. Nicht assimiliert werden die polymerisierten Kohlenhydrate wie Stärke, Dextrin usf.

2. Als Stickstoffquelle eignen sich außer organischen Verbindungen auch anorganische Salze: Nitrate und Ammoniumsalze.

Nachdruck verboten.

Further studies on variation in physiological activity in B. coli.

[From the Bacteriological Laboratory Messrs Welford & Sons, Ltd.
London, W.]

By **Cecil Revis.**

In some work already published (1 2 and 3) it has been shewn that a change in physiological activity towards certain carbohydrates and polyhydric alcohols can be induced in B. coli by a more or less prolonged growth in ordinary peptone broth containing malachite green (up to 0.1 per cent). This change consists in an entire loss of the power to produce gas from these substances, acid only being formed in the media, though no loss in general vitality or activity of the organism occurs, and the condition, so brought about, is of a permanent character, in so far as the term is applicable to bacteria. It was also shewn (2) that this change was apparently confined to organisms which could be termed "typical" coli (acid coagulation in milk, and acid and gas in lactose, dulcitol, glucose and mannitol peptone waters, with positive indol and negative Voges and Proskauers's, reactions) as such types as B. acidi lactici Hueppe and B. lactis aerogenes, did not appear to be affected by growth

under the same conditions. A series of experiments have now been carried out substituting Brilliant Green for Malachite green, and by this means it has been found possible to bring about similar changes in the other types mentioned above and also to produce still more profound effects in the case of B. coli, as it has been found possible either to destroy entirely certain of the fermentative powers of that organism or to cause them to fall into such abeyance that it seems probable that the continued investigation, which is still progressing, will lead to complete destruction of these properties. The results here recorded are not final, but as the investigation has reached a stage in which the connection with the original cell employed is still possible, even if faint, in many cases, and as the time element in these experiments is long, it seemed better to place them on record at this point, the cultures being used in the continued investigation being those arrived at at the conclusion of this stage.

As there appears to be in certain quarters a somewhat deeprooted objection to acknowledge that these changes are possible, and that their occurrence is to be explained on the grounds of the use of a mixed culture as a starting point or of contamination during the subsequent procedure, it is perhaps better to state at once that neither of these objections holds good for the results here recorded.

In every case the original culture was obtained by repeated plating and, as I have already stated in a former paper and as is held by Eisenberg (4), there is no doubt that in the case of such organisms as those of the colon group this procedure is quite satisfactory for the purpose of arriving at a culture derived from a single cell, and from which all danger of admixture is eliminated.

Even a minimum of care will safeguard cultures from contamination during re-inoculation, and it is perhaps unnecessary to say, that the greatest care has been observed in every stage of this investigation. A study of the experimental stages will shew however the continuity of the strains with the original culture.

The conditions etc., of media and method are identical with those usually employed. Peptone waters containing 2 per cent of the test substance have been employed and incubation was always at 37° C when testing.

In order that no trace of the dye-stuff should adhere to the organisms and so be responsible in any way for the changes noted, dilutions were made from the actual test cultivations in brilliant green broth, into peptone water and after several hours standing, plates were spread on ordinary nutrient agar from these, and the plates were incubated at 20° C in order to allow of the development of any organisms which might have been somewhat weakened. Colonies from these plates were then inoculated into peptone water tubes, and these were then allowed to grow (usually at 20° C) until a strong development had taken place. These tubes were then used for inoculating the test media, heavy inoculations being always made. By this means, only actively growing and vigorous cultures were tested and any danger of error from the use of too few or of enfeebled organisms, was avoided. In fact every care was taken to avoid the appearence of any transitory modifications that the organisms might have undergone. Emphasis must also be laid on two other points. 1. In spite of the profound changes which some of these organisms underwent, there was absolutely no loss of general vitality or developmental power. In some cases the power to grow at 20° C was very much modified and became very slow, but in all cases, growth at 37° C was unchanged in any respect; at the same time the organisms acquired a full measure of tolerance to the dye stuff, for whereas, at the start, care had to be exercised by employing very weak dilutions of the dye stuff before proceeding to greater strength, cultures of organisms so trained, did not, when grown on ordinary media, lose their power to grow in concentrations from which they had been taken. 2. The changes in physiological activity were in no case sudden. They were gradually brought about as the result of exposure to a certain environment and for this reason, it may not be altogether fanciful to suppose that though the environment is in these cases quite artificial, there are conditions in nature which bring about similar changes in due time.

As a further safeguard against error, an attempt was made to carry on these experiments with each organism in duplicate in order to provide a control for the results obtained. This attempt however resulted in complete failure in nearly all cases. In fact no point in these experiments and in fact in all experiments in which different individuals of one culture (arising from a single cell) are treated in a similar manner, stands out with greater clearness, than that these different individuals shew sooner or later divergences of greater or less extent from one another; and it is by steadily separating off those organisms which shew the most marked divergence from the original strain at each stage, and exposing these to the same environment again, that the originally slight divergences at last become considerable, and a strain arises markedly different to the original strain, and possessing properties which have become fixed and not simply altered in some ephemeral manner by a lowering of the general vitality of the cell, to pass away and give place the original activity when the vitality of the cell is restored by growth in a more suitable environment.

The following procedure was followed out in all the experiments here detailed. The cultures were obtained as stated above by repeated plating. A gelatin culture was kept going for comparison at the end of the experiment, whilst inoculations were made into ordinary nutrient broth (+ I) containing the dye-stuff and kept at 37° C. Practically all the organisms were very sensitive to brilliant green and malachite green, and it was necessary to start with very low concentrations (B. G. 0.004 per cent and M. G. 0.02 per cent) and these were slowly increased by weekly re-inoculations until 0.05 per cent was attained. This concentration was not exceeded as the organisms did not develop well in higher percentages and also it is approaching the saturation point for the dye stuff. The organisms were much more sensitive to brilliant green than to malachite green. As soon as the organisms had accustomed themselves to the final concentration of the dye stuff and were growing rapidly and well, the cultures were plated out after dilution in peptone water, on ordinary nutrient agar (+ I) and the plates (after the surfaces had been dried) kept at 20° C till colonies were well developed. It was comparatively rarely that plates were obtained on which only one type of colony was present.

Sometimes the characteristics of the colonies present were so diverse as to give the impression of a mixed culture, but these appearances were only due to divergence in the mode of growth of the organism itself. They are only briefly referred to in the results, as morphological changes were not being studied. On account of the great care taken to avoid any contamination no other organisms than the experimental ones were ever found on the plates with the rare exception of a mould. Of the colonies, so obtained a number (usually those most diverse in character) were inoculated into peptone water, and allowed to grow well at 20° C, after which the series of test media were inoculated heavily from the peptone tubes and the tests kept at 37° C for three weeks. In general, a full reaction in these media is developed within 48 hours. For this reason no account is taken of any differences observed under that period.

From the results of the tests, the cultures made from those colonies which shewed the greatest change (if any), were re-inoculated into brilliant green or malachite green broth and kept at 37° C, with weekly re-inoculations as before. After a further period of usually about three months, the plating out was repeated and another selection of colonies made. In this manner the line of least resistance was followed and the most susceptible individuals of each culture studied. The examination of these plates shewed conclusively that not all the members of a culture are affected in the same manner, and further that, as a rule, those organisms which, on plating out produced the best developed colonies, were usually those which had undergone the greatest modification. This fact is of importance, as it is greatly against any argument that might be brought forward, that these changes are due to a loss in vitality on the part of the organism. Morphological and microscopical changes were noted, but no great attention was paid to this side of the investigation. All the experimental organisms shewed the tendency to filament formation which has been noted before (2), though they exhibited it, in varying degrees. These filaments do not appear to be of the nature of "involution" forms as they persisted in culture, when the organisms was removed from the action of the dye stuff.

The following types were investigated:

B. coli (three typical forms), B. acidi lactici Hueppe (one strain) and B. lactis aerogenes (one strain).

In the description of the results, the following signs are used.

A = acid, A sl G = acid and slight gas, A & C = acid and coagulation (in the case of milk), +, ++, +++, and ++++ signify that besides acid, gas was formed in the gas tube to the amount of $^1/_8$, ¼, ½, and ¾ inch or more respectively. No reaction is signified by the negative sign (—).

All test substances (except milk) were employed as 2 per cent solutions in ordinary peptone water (made from Witte's peptone). They were of the purest kind available, and did not give false reactions. It will simply be necessary to state here that any changes in fermentative power were always confirmed and in case of disappearance of any such power, the tubes were usually tested in order to see that the non-appearance of change was not due to any inhibitory effect of the medium. The large quantities of test media employed and their use in concurrent work of a different kind, practically eliminated any chance of error of observation due to any peculiarity in the test media themselves.

Bacillus coli No. 1.

This organism was isolated from horse-dung. It was quite typical in every way. Its properties, which were quite unchanged in the control gelatin culture at the end of the experiment, were:

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Milk	A & C	48 hours
Lactose	+++	48 „
Saccharose	+	48 „
Adonitol	—	—
Dulcitol	++++	48 „
Inulin	—	—
Glucose	+++	48 hours
Salicin	+	10 days
Mannitol	++	48 hours

Malachite green.

The organism was started in Malachite Green broth (0,02 per cent) and was worked up to 0.05 per cent. On plating it grew well and typically at 20° C. Microscopically, both typical forms and long filaments were present.

The 48 hours results were: Milk A & C, Lactose, Dulcitol, and Mannitol acid only. Saccharose and Salicin acid only, on the 10th day. Subcultivation only changed the acid production in Saccharose to 48 hours.

Some of the colonies tested were kept going in M. G. broth and again tested after an interval of about 12 weeks, but no further change had been produced, except that Salicin was not attacked at all.

Filament formation was much more pronounced than at the first testing.

All attempts to restore the power of gas formation failed.

The effect of the Malachite Green was to destroy the power to bring about the complete fermentation of the test substance without affecting (except in the case of Salicin) the preliminary acid change.

Brilliant Green.

A culture from one of the colonies of this last plating was started in brillant green broth (0.01 per cent) and was worked up until it was growing well in 0.05 per cent. On plating out on agar at 20° C, no colonies appeared for several days, after which two types of colony arose.

1. Large colonies. Organisms typical microscopically.
2. Small colonies. Many filaments present.

Subcultures on gelatin also grew excessively slowly, the growth being scarcely visible until the 13th day, after which the organism grew well. On agar at 37° C, the growth was typical and strong in 24 hours (see below).

The two types of colony (1 and 2) were tested with the following results:

1. Milk. A, 48 hours C, 13th day, Lactose and Glucose acid only. No other change.

2. Milk. A, 7th day. No coagulation, Lactose acid in 72 hours, Glucose 48 hours. No other change.

Note, no action on Dulcitol or Mannitol, Salicin or Saccharose. Subcultures were made on gelatin at 20° C and again tested.

1. Milk. A, 48 hours C, 72 hours, Lactose, Dulcitol, Glucose and Mannitol, acid, 48 hours. Saccharose acid, 10th day, Salicin acid 7th day. No further change. Note return to original activity.

2. Milk. A, 48 hours C, 5th day, Lactose and Glucose acid 48 hours, Dulcitol, acid on the 7th day. No further change.

This culture of (2) was again subcultured on gelatin and tested:

2. Milk. A, 48 hours C, 6th day, Glucose, acid 48 hours, Dulcitol and Saccharose, acid on the 6th day. No other change (lactose not attacked).

It was again subcultured on gelatin and tested:

2. Milk. A, 48 hours C, 5th day, Glucose, acid 48 hours, Lactose, acid on the 5th day. No other change.

These results are remarkable. The fermentation of Mannitol in these gelatin cultures has completely disappeared, as also had that of Salicin. The others shew curious fluctuations and delays, sometimes being attacked and sometimes not.

The impression given was, that the organism was in a state of instability as regards its power to attack Dulcitol, Lactose, and Saccharose. This culture has been continued in B. G. broth and will probably in time lose these powers altogether. The gelatin culture grew slowly at 20° C, but always eventually strongly. Only this well developed growth was tested, which of course, grew well in the peptone water at 37° C. Growth of the cultures at 37° C on agar shewed considerable revivifying effect.

The agar cultures referred to above were tested with the following results:

1. Milk. A, 48 hours C, 5th day, Lactose, Dulcitol and Glucose, acid in 48 hours. Saccharose acid on the 5th day.

2. Behaved practically the same, except that Saccharose was not attacked. In neither case, was Mannitol or Salicin attacked.

The alterations so far produced in this organism are 1. **Complete loss of power to produce gas.** 2. **Loss of power to attack Mannitol and Salicin at all.** 3. **Considerable inhibition of growth at 20° C.**

Bacillus coli No. 2.

The investigation with this organism has been briefly recorded elsewhere.

It was originally isolated from milk and had the following physiological properties:

Milk	A & C	48 hours
Lactose	+++	48 „
Saccharose	—	—
Adonitol	—	—
Dulcitol	++++	5 days
Inulin	—	—
Glucose	+++	48 hours
Salicin	+	5 days
Mannitol	++++	48 hours.

Malachite Green.

The organism was started in M. G. broth (0.02 per cent) as usual and worked up to 0.05 per cent strength. The colonies were very large and slimy on plating out and filament formation was very pronounced.

The colonies on testing gave the following results:

Milk. A, 48 hours C, 5 days, Lactose, acid 48 hours, Dulcitol, acid 4 days, Glucose, acid 48 hours, Salicin, acid 4 days and Mannitol, acid 48 hours.

One of these colonies was plated out on agar at 20° C. All the colonies obtained were large and slimy and microscopically, shewed very numerous and long filaments.

Two of these colonies were tested. One refused to grow in any of the test media.

The other gave — Milk. A, 48 hours C, 5 days, Lactose, acid 48 hours, Dulcitol, ? acid 20 days, Salicin and Mannitol, acid in 5 days. Note that the organism has become less active by simply plating out (c. p. Coli 1).

The organism underwent no further change even after 5 months growth in M. G. broth. The filament formation was always more or less pronounced, sometimes the whole culture consisted of long tangled filaments, and sometimes many typical forms were present. Slime formation was very variable, as typical colonies were often obtained on the same plate with those of the large simly variety. There was however no difference in physiological power. Filament formation was apparently gradually lost on repeated subculture on gelatin extending over a long period, but this was not accompanied by any recovery of fermentative powr.

Brilliant Green.

Two cultures of the original organism were also started in B. G. broth. One however, shewed great difficulty in developing in presence of the dye and eventually refused to grow.

The other however survived and then grew well. The further testing of this organism has been recorded elsewhere. The final stage arrived at was, that two varieties arose from the original culture.

1. Which was only slightly, changed from the original type, but which refused to undergo further modification, and 2. which was profoundly and progressively altered by exactly the same environment. The properties of 1. where:

Milk. A & C, 48 hours, Lactose, A. sl. G. 48 hours, Dulcitol + in 8—14 days, Glucose, ++ 48 hours, Salicin, A. sl. G, 7 days Mannitol, + 48 hours. No further change took place, and every attempt to restore the full activity in Lactose, Dulcitol and Mannitol failed; in fact in the case of Dulcitol the reaction became weaker on repeated inoculation in Dulcitol peptone water.

The properties of (2) were:

Milk. A, 5 days, Lactose, acid 48 hours to 5 days, Glucose, acid in 48 hours. Salicin, acid 7—10 days, Mannitol, acid 5 days.

As with coli 1, this organism was growing very slowly at 20° C but quite vigorously and normally at 37.5° C.

Agar cultures however shewed no greater activity, the test being as follows.

Milk. A, 48 hours, Lactose acid 48 hours, Glucose, acid 48 hours, Mannitol, acid 8 days. No other change.

Gelatin sub-cultures were somewhat less active. In one case Lactose was not attacked at all, or only gave a doubtful acid reaction in 17 days. The various cultures shewed slight differences among themselves as regards the exact time at which reaction took place, and these differences persisted in their respective subcultures. A slight increase in activity, so far as the onset of the acid reaction is concerned, was bought about by growth at 37° C, but the cultures were physiologically profoundly different to the original strain, and were quite permanent in their properties. The chief alterations in this case were: 1. Complete loss of power to produce gas, 2. Loss of power to attack Dulcitol at all, the action on Mannitol being very slow.

Great interest however attached to the fact that two different strains arose in the same environment, one of which was resistant to the dye and the other profoundly altered. This will be referred to later.

Bacillus coli No. 3.

This organism had been separated from cow-dung. The original physiological properties of the organism were:

Milk	A & C	48 hours
Lactose	++	48 „
Saccharose	+	48 „
Adonitol	—	—
Dulcitol	++++	48 „
Inulin	—	—
Glucose	+++	48 „
Salicin	++	5 days
Mannitol	+++	48 hours

It was in every way quite typical.

Malachite Green.

The organism was started in M. G. broth and shewed considerable power of development in presence of the dye. Plated out after several months treatment, it shewed no alteration except that coagulation in milk did not occur and some of the colonies did not attack Saccharose.

One of these non-Saccharose fermenters was grown in M. G. broth for a further period, and on again plating shewed no change, though some of the colonies produced acid in Saccharose after a long delay (21 days). By repeated subculture in Saccharose peptone water, this became a typical + reaction in 48 hours.

Brilliant Green.

One of these non-Saccharose fermenters was started in B. G. broth and was worked up to the full strength. On plating out on agar at 20° C, the colonies only appeared after a very long delay (about 8 days).

On agar plates at 37° C however, they developed normally and vigorously two kinds of colony being obtained:

1. Large, watery and translucent.
2. Small and white.

Microscopically the organisms were largely typical but there was a distinct tendency to growth in chains of short bacilli. (c. p. filament formation in other types).

On testing these gave the following results:

1. Milk. A, 72 hours but did not coagulate, Lactose ++, Dulcitol ++++, Glucose ++, Salicin +, in 72 hours. Saccharose, acid 17 days. Mannitol was not attacked.

2. Milk. Acid 72 hours, sl. coagulation 14 days, Lactose acid 72 hours, ++ in 5 days, Dulcitol ++++, Glucose +++, Mannitol ++, 72 hours, Salicin, acid 72 hours, ++ in 5 days, Saccharose not attacked.

Note the great difference in vigour exhibited by these, and that the organism shewing the better development on the plate is the less powerful.

A subculture of 2. did not attack saccharose.

As noted above, the original plates on agar at 20° C grew very slowly, but eventually colonies developed of exactly similar appearance to those described above: and microscopically very many long chains of short bacilli were seen.

On testing they gave the following results:

1. Milk. A, 5 days and very sl. coag. 21 days, Lactose A. sl. G 10 days and no more, Dulcitol +++, Glucose ++ 48 hours, Salicin ++ 72 hours. Saccharose and Mannitol not attacked.

2. Exactly as (1) except that Mannitol gave a +++ reaction in 5 days. Note the similarity between the types of colony at 37° and 20° with regard to the Mannitol reaction.

A subculture of the non-Mannitol fermenter (1) from the plate made at 20° C was grown on agar at 37° C. It developed quite typically and gave a ++++ reaction in Mannitol in 72 hours. Saccharose was not attacked and Milk did not coagulate.

A subculture of the same colony on gelatin at 20° C grew very slowly but eventually quite strongly. In this case Mannitol was not attacked. Saccharose was not attacked, Milk did not coagulate and Lactose was only feebly and slowly fermented.

This organism (Coli No. 3) did not shew the great changes recorded in the other cases. There was no tendency to change to the type which has lost the power to produce gas, and the chief interest lies in the effect of blood heat temperature on the Mannitol reaction. The loss of power to attack Saccharose, and to coagulate milk may be noted. The failure to produce change in this organism is remarkable, as there was no reason for believing it to be any less typical than Colis Nos. 1 and 2. It shows the powers of resistance of B. lactis aerogenes (see below) and closely follows that type.

Bacillus acidi lactici Hueppe.

The properties of the cultures employed were as follows:

Milk	A & C	48 hours
Lactose	+++	48 „
Saccharose	—	—
Adonitol	++++	5 days
Dulcitol	—	—
Inulin	—	—
Glucose	++++	48 hours
Salicin	+	7 days
Mannitol	+++	48 hours

It was quite typical in every way.

Malachite Green.

The organism was started in M. G. broth and gradually worked up to the full strength, but it experienced great difficulty and had to be cautiously dealt with.

The malachite green was not at any time completely reduced. After about 30 re-inoculations, it was plated out and tested, but shewed absolutely no change, except that the growth at 20° C was rather slow. After a further period of treatment it was again tested but no physiological change had occurred. Two kinds of colony developed and microscopically there were considerable differences. In one kind only typical organisms interspersed with a few filaments appeared, whilst in the other kind, filaments predominated which shewed curious spindle-shaped expansions. This spindle formation persisted through several generations on gelatin at 20° C.

Brilliant Green.

A culture from one of the colonies shewing this formation, was started in B. G. broth and was worked up to the full strength.

After 25 re-inoculations it was plated out on agar at 20° C and also at

37° C. The plates at 20° developed colonies only after a long delay (about 8 days).

Two types then appeared:

1. Large and typical.
2. Very small, thin and translucent.

Microscopically the organisms present in both of these were quite different to those of the original culture, consisting entirely of rather long very delicate rods. Their subsequent history, however, identified them as the test organism.

On testing these two types, the following results were obtained:

1. Milk. A, 48 hours, C, 3 days, Lactose A. sl. G 48 hours and no more. Adonitol ++, and Mannitol +++, in 72 hours, Glucose ++++ 48 hours and Salicin +++ 5 days.

2. Milk. A, 72 hours and sl. coagulation, 7 days, Lactose acid, 4 days then gradually to ++ reaction, Mannitol ++++ on the 7th day, Glucose +++ 48 hours. No other change.

This last (2), was grown on gelatin at 20° C for three weeks, again tested with the following results:

Milk. A, 72 hours, C, 5th day, Lactose, acid 48 hours and no gas at any time, Adonitol ++++ 5th day, Glucose +++ 48 hours. Mannitol not attacked.

It is very curious that the subculture restored the Adonitol reaction (which serves to identify the organism) whilst Mannitol which was attacked before, was not fermented in this case.

It is also necessary to note that of the two organisms (1) is quite typical and unchanged whilst (2) has evidently been affected by the treatment (c. p. Coli No. 3).

The plates made at 37° C grew well and normally and shewed exactly the same types of colony as on the plates at 20° C.

The two types were tested with the following results:

1. Milk. A, 48 hours C, 10 days, Lactose and Glucose acid 48 hours, Salicin acid 7 days. No gas was formed at any time and no other change took place.

A subculture of this on agar at 37° C grew well and gave the following results:

Milk. A, 72 hours C, 7 days, Lactose and Glucose, acid 48 hours Adonitol, Salicin and Mannitol, acid in 4 days. No gas in any of the tubes.

A subculture on gelatin at 20° C grew very slowly (10 days elapsed before a strong growth appeared). On testing:

Milk. A, 48 hours C, 7 days, Lactose and Glucose, acid 48 hours, Adonitol, acid in 7 days. Mannitol was not attacked.

The complete loss of gas formation (cp. B. coli) is to be noted and the effect of blood-heat temperature in restoring the Mannitol reaction is the same here as in other cases.

2. This type of colony came up very slowly on gelatin when taken from the agar plates at 37° C. It gave the following results on testing:

Milk. A, 72 hours C, 9 days, Lactose + on the 9th day, Glucose +++ 48 hours. No other change.

A subculture of this on agar at 37° C gave the following result:

Milk. A, 5 days C, 12 days, Lactose. A. sl. G 7 days and + reaction on the 12th day. Salicin. A. sl. G. 7 days and + reaction on 12th day. Mannitol. acid 5th day and + reaction on the 7th day, Adonitol ++++ on the 5th day, Glucose +++ 48 hours.

A subculture on gelatin at 20° gave the following results:

Milk. A, 5 days C, 13th day, Lactose. acid 10th day and no gas, Adonitol. +++ 48 hours, Glucose. +++ 48 hours and Mannitol. ++ 9th day.

In these two types (1) and (2) we have a case exactly parallel to that recorded above, under No. 2 (B. coli) one type profoundly altered with

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

loss of power to produce gas, and another type shewing a partial change in some of the original physiological characteristics.

Bacillus lactis aerogenes.

This organism was originally separated from cow-dung and had the following properties.

Milk	A & C	48 hours
Lactose	+++	48 „
Saccharose	++++	48 „
Adonitol	++++	48 „
Dulcitol	++++	48 „
Inulin	—	—
Glucose	++++	48 „
Salicin	++++	48 „
Mannitol	++++	48 „

This type of organism is particularly interesting, as judged by its power to attack sugars and polyhydric alcohols it is the most vigorous of the coli group.

Malachite Green.

Two strains from the original culture were used and were started in M. G. broth. They experienced no difficulty in growing in this medium shewing a marked tendency to grow in „pellicle" form. After 29 subcultures in M. G. broth, they were plated out and tested. Beyond a slightly retarded growth on agar at 20° C, no change whatever had occurred.

Brilliant Green.

The same two strains were carried on in B. G. broth, direct from the M. G. broth. They shewed slightly differences as is usual. One always reduced the dye, the culture becoming colourless, the other did not do so. Skin formation was marked in both cases. When both were growing vigorously in the full strength (0.05 per cent), they were plated out and both grew well on agar at 20° C.

In one case (α) all the colonies were typical of B. lactis aerogenes, but in the other case (β), there were a great number of small translucent colonies resembling B. coli.

On testing (α) a slight delay in the onset of the fermentative change was noticed, but this, once started, proceeded rapidly to a maximum, with the exception of Adonitol, in which the beginning of the reaction was delayed to 72 hours and then developed slowly. The glucose peptone tubes in all cases shewed a clear liquid with a heavy flocculent precipitate (the original cultures gave a uniformly turbid liquid).

The results with (β) were similar in most cases. The "coli like" colonies exhibiting only a retardation, but no real change in physiological activity. In this case all the glucose peptone tubes exhibited a uniform turbidity. A colony from each of these strains (α and β) which shewed the greatest retardation were continued in B. G. broth. Both grew well, but one (α^1) grew very strongly, developing a thick slimy growth, the dye being rapidly and completely reduced. On plating out eventually, only one kind of colony developed at 20° C, and these came up very slowly. On testing, there was practically no change, except that the Adonitol reaction was much delayed and milk did not coagulate under 9 days. The glucose peptone tubes were clear with a heavy flocculent deposit.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

The Adonitol reaction remained delayed ever after preliminary culture in peptone water at 37° C.

The culture derived from the other colony (β^1) gave similar results, but as before the glucose peptone tubes were uniformly turbid.

These two strains were stopped at this point and one from the same original culture as (α) and which had been used in some similar experiments with methylene blue, tried.

This strain had undergone no apparent modification as a result of its treatment with methylene blue.

It was started in B. G. broth and was worked up easily to the full strength.

After the usual series of re-inoculations it was plated out and two kinds of colony appeared on the plates:

1. Large, white and well-developed.
2. Very small, translucent and slow growing.

Microscopically (1) consisted of short thin bacilli, and (2) of plump rods. The gelatin cultures made from these, were of the coli type and not of the aerogenes type, shewn by the original culture.

On testing (1) full reactions were obtained in 48 hours in Dulcitol, Glucose, Mannitol and Salicin only. Milk did not coagulate till the 8th day, Lactose was only + in 48 hours and +++ in 72 hours. Saccharose and Adonitol were not attacked before the third day. Growth was quite strong in the tubes in 48 hours.

The general activity was decidedly lessened as regards the time of onset of the reactions, but the extent of the fermentation when it did take place, was in no way diminished.

On testing a peptone water culture of (2) made direct from the plates no growth occurred in any of the test media. A subculture was therefore made from the corresponding gelatin culture, on agar at 37° C and then tested.

The following results were obtained:

Only Glucose gave a full reaction in 48 hours, the other reactions were only given after 72 hours, and then were diminished in the case of Lactose and Saccharose. Acid only was formed in Salicin and Mannitol was not attacked.

From the agar culture employed for this test, ordinary peptone water was inoculated and grown at 37° C for 48 hours and then tested. There was no gain in activity except in the case of Mannitol which was attacked on the 10th day. The reactions in Lactose and Saccharose were rather weaker.

The original gelatin culture of (1) was then plated out on agar at 20° C. The plate grew fairly quickly with one type of colony. Two of these on testing gave the following results:

A. Full reactions in 48 hours in Adonitol, Dulcitol and Glucose. Lactose was acid in 48 hours, but the reaction went no further. Saccharose gave a + reaction on the 4th day and no more. Salicin and Mannitol were not attacked. There was however a strong growth in all the test media.

B. The reactions were normal in all media except Salicin and Mannitol, though the onset was delayed to 72 hours. Salicin developed acid in 72 hours and then A. sl. G. Mannitol was not attacked.

(The Mannitol tubes in these tests were tested and found to be fermented by the original test cultures.)

Very similar results were obtained by growing in M. G. broth a culture of this organism which had been tried in methylene blue broth without change.

After about 16 re-inoculations the colonies obtained on plating on agar at 20° C appeared excessively slowly, though there was no delay at 37° C.

Of the colonies tested one was of particular interest. A full reaction was obtained in 48 hours in Glucose and Mannitol. It was delayed in Saccharose, Lactose and Dulcitol. Adonitol was not attacked.

On growing the organism on agar at 37° C the reactions appeared somewhat more rapidly, but Mannitol was not attacked, Adonitol giving a typical result in 72 hours.

A culture in peptone water was made from this agar culture and grown for 48 hours at 37° C and tested, when a typical reaction appeared thoughout except that the attack on Mannitol was delayed.

The gelatin culture, made direct from the original agar plate, was plated out on agar at 20° C. Growth was again extraordinarily slow, the colonies and the organisms composing them being quite atypical.

On testing, Dulcitol, Glucose and Salicin were fermented in 48 hours in a normal manner. Lactose and Adonitol were delayed until the 3rd day, whilst Saccharose and Mannitol were not attacked at all.

A gelatin culture of one of these colonies was made and again tested, when practically the same results were obtained, except that in this case, Salicin was not attacked. As before Mannitol and Saccharose also gave a negative result.

In both cases when these organisms were grown on agar at 37° C before testing, they regained their full activity.

A culture of the same organism from methylène-blue broth (see above) which had been grown in B. G. broth without change was tried in M. G. broth, and went through almost exactly the same changes which have just been described. Gelatin cultures at 20° C shewed diminished activity particularly in the case of Mannitol which was not attacked, whilst parallel cultures on agar at 37° C, gave typical results in all cases.

It is evident from the above results that B. lactis aerogenes, undergoes modification with great difficulty. It appears to reach a stage in which the exhibition of physiological activity is somewhat capricious. It is however quite evident that any effect produced by its environment, persists through gelatin cultures at 20° C, while the effect is lost rapidly if growth takes place at 37° C on agar. This is noteworthy, as the organism grows at 37° C in the peptone water containing the test substances, even when tests are made from gelatin cultures, and yet in some cases the test substance is not then attacked.

Conclusions.

As explained in the early part of this paper, these experiments record results which are probably not final as regards the organisms concerned. It is however possible to make certain general statements which they seem to substantiate to some extent. Any thing in the way of complete proof could only be achieved after very long and extensive work.

1. It may be taken from these experiments and from others on the same lines recorded elsewhere (1 and 3), that organisms of the typical B. coli type and also B. acidi lactici Hueppe can undergo a change in physiological activity resulting in an entire and permanent loss of gas-producing power when grown in the presence of certain sugars and polyhydric alcohols, and that in general, this change usually occurs as a result of growth in presence of malachite green and brilliant green.

2. The action of brilliant green is very much greater than that of malachite green and prolonged growth in the presence of this latter, may carry the organism to a stage in which the power to produce even acid from certain test substances is lost in a permanent manner.

3. That in cases in which such complete loss of power results, the test substance is a polyhydric alcohol or glucoside and not a sugar (with the possible exception of Saccharose).

4. Not all individuals of the same culture (arising originally from a single cell) behave in a similar manner. Under the same circumstances strains may arise which differ from the original and from one another and may be stable to the environment.

5. Organisms of the B. lactis aerogenes type show a very great resistance to malachite and brilliant green, no permanent change having been as yet produced. Certain strains shewed however, marked and capricious fluctuations in the exhibition of certain physiological changes. One strain of B. coli used (No. 3) shewed a similar resistance to the dye stuffs and it may not be too great an assumption to suppose that this organism was not a true B. coli in spite of its apparently typical properties.

6. The organisms which survive and eventually grow in presence of these dye stuffs, retain their full vitality, always as regards growth at 37° C and generally as regards 20° C, though in some cases, growth at the lower temperature was excessively slow in its appearance, though followed by normal development. Morphological changes on culture media are common and the original typical form is constanted departed from. Microscopically, there is a great tendency to the production of filaments of extraordinary length and also of (in some cases) a mucilagenous secretion. The "filament" formation is often carried through many generations. Growth of these organisms in (+ I) nutrient broth containing the dye stuff, is sometimes extraordinary and atypical. B. coli often produces a thick viscous deposit while B. lactis aerogenes grows with a distinct and tough pellicle. The dye stuff was usually, but not invariably reduced.

7. A permanent effect on the physiological activity of the germ plasm can be produced by prolonged exposure to malachite and brilliant green. The change produced does not take place suddenly but is the result of gradual acclimatisation. It is probable that this is the result of successive selection in the growth of individuals of the same culture, and this selection was artificially favoured as much as possible. It must be remembered that this selection is from the descendants of a single cell, and that therefore change has taken place in the germ plasm, without the intervention of syngamy.

When it is considered that malachite green and brilliant green are substances largely used for the separation of organisms of the typhoid, paratyphoid and Gärtner groups from concurrent and probably more abundant organisms of the coli group, it is note-worthy that the organisms of this latter group, when trained to grow in presence of these dyes, develop the physiological characteristics of the former groups; that is to say, the change is to a type which only produces acid, or to one in which activity towards lactose is diminishing, whilst glucose is attacked with full vigour; and as other experiments, now in progress, seem to shew that a similar change may take place under entirely different and more natural circumstances, the discriminating effect is not probably due to any chemical action of these dyes but rather to their correlation to some physiological state of the organism.

The orthodox cause (at the moment) of the physiological action of these organisms is the activity of enzymes, which have the necessary appropriateness to the substrate with which the organism is in contact. If such a view be held, and it must be remembered that no such enzymes have as yet been isolated from bacteria, it must be also conceded that at least two such enzymes are necessary to bring about the production of acid and gas from any particular test substance; and the experiments here described shew that either one or both of these enzymes may be destroyed, or the organism rendered incapable of developing them, after exposure to the action of such substances as malachite and brilliant green, and further that this incapacity is transmitted to individuals produced by cell division from organisms which have been rendered so incapable, and that, therefore some effect has been produced on the protoplasm of the cell itself, which, in part at least, is common to all individuals which arise from that cell.

In many instances, before the power to produce acid in any certain case has been lost, there is a period in which great delay occurs before the reaction is exhibited. If an enzyme is necessary to cause this reaction, it is also necessary to assume that, in such a case, it is no longer preformed in the cell, but has been called into play by the presence of the substrate, though there seems to be no reason why delay (often 14 to 20 days) should take place. The impression forced on the observer is exactly that of a "recollection" on the part of the organism, of a power which it once had. This, of course, is the usual view, and some assume, as with Burri, that every such necessary enzyme is present potentially in every cell. We are then presented with the problem "How long a period must elapse before the "recollection" ceases to be a "recollection", and becomes the exhibition of a new physiological change?" Under which heading for instance must be classed the observation of Twort, that the typhoid bacillus will produce acid in lactose after a prolonged period of re-inoculation in presence of that sugar? It is certain, however, that simple growth in the presence of a certain substrate is neither a rapid, nor necessarily possible, way to the development of the power to attack the substrate. At the same time, when attack has been definitely established, re-inoculation in presence of the substrate usually leads to a more or less rapid decrease in the time of onset of the attack; though it does not follow that the production of acid, which may have at first taken place in three weeks and eventually occur in 24 hours, will finally lead to gas production.

In the case of B. coli the exhibition of physiological power typically usually follows a definite and constant course under the conditions which are usually assigned to it, and the final result is the sum total of the various activities of all the individuals composing the mass used for inoculation and does not necessarily, by any means, express the activity of any one of those individuals;

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

but there are undoubtedly organisms of this group which, while usually looked on as atypical or degenerate and consequently put aside without further notice, shew clearly that either the production of acid or of acid and gas, is extremely sensitive to what might be termed "minute" changes in the conditions of experiment.

Such are: the substitution of nutrient broth for peptone water as a solvent of the test substance; preliminary incubation at 37° C before testing; massiveness of the inoculation; the presence of a substance such as magnesium hydroxide, which may or may not act simply as a neutraliser of acid; the presence of a heated and killed culture of other organisms (notably Proteus vulgaris); and so on. Such effects as these, whilst by no means excluding the agency of enzymes, seem to point rather to some effect on the general biological activity of the protoplasm, in which the mediation of enzymes is not necessarily to be assumed.

For want of a better hypothesis, a simple view of the physiological activity of these organisms is afforded by assuming a similar condition of the protoplasm to that which has been assumed by Ehrlich to explain the production of "antibodies". If the test substance simply links on to a "side chain" of the germ plasm as a preliminary stage, it might be then completely broken down, and the energy evolved absorbed by the organism. It is not indeed altogether impossible to suppose that the germ plasm of the organism itself may function as an "oxidase"[1]), both the fixing of the test substance and the formation of the peroxide grouping being an ordinary chemical change on the part of the germ plasm, the subsequent action of one on the other being determined by the proximity of two groupings.

Secondary chemical reactions occasioned by proximity of certain groupings in the molecule, and their determination by such proximity; the directive effect of space arrangement; the phenomenon of steric hindrance; the occurrence of pseudo-acids, and bases exhibiting in the molecule itself the mutual neutralising effect of opposing radicles, are all facts which rest today on a sure foundation. Seeing that the constitution of the cytoplasm may be regarded very largely as a chemical, even if very complex, entity, it is surely not a great assumption to suppose that it may exhibit similar phenomena.

Under certain circumstances, it may be assumed that these side chains link up with one another, in a similar way to that which occurs in lactone or anhydride formation in chemical substances, and the organism so rendered incapable of union with the test substance. Within certain limits of time, this linking up might be again resolved, but a stage might come when such resolution would require so long a time, that the condition which had obtained might be looked on as permanent.

It is easy to conceive that an alteration of this kind, produced in the actual germ plasm, would be transmitted to descendants which have arisen by simple cell division.

From the fact that, when the power to produce gas is lost for one test substance it is usually at the same time lost for all, it might be assumed that, whilst the cause of acid production was specific, that of gas production might be general. This however, is doubtful, because in those cases in which the acid stage has been carried, by successive re-inoculations, to the gas producing stage, there is not always a correspondingly increased activity in other directions; for instance, enhanced activity brought about in such manner towards Lactose, does not necessarily mean, that enhanced activity towards Glucose is concurrently achieved and vice versa.

---

[1]) c. p. the fact that lactic acid production is directly proportional to the number of organisms present and that gas production by B. coli is accompanied by enormous development.

In conclusion, a few words are necessary as to the bearing of these experiments on the evolution of the coli and allied groups. Assuming, (in spite of the circulus in probando) that such evolution has taken place from ordinary putrefactive types which cannot attack carbohydrates, it must be noticed that the action of these dye stuffs is to throw B. coli back to the great dividing line, which the production of acid forms. It is the power to survive in presence of acid which is undoubtedly the cause of the existence of the type of organisms which forms the coli and allied groups.

The extreme sensitiveness to acid of organisms of the putrefactive type is most marked and renders their conversion into acid-producing types experimentally excessively difficult. When sure and reliable means are found to render putrefactive organisms invulnerable to their own acid production, it will probably not be a difficult problem to show the manner in which the coli group has arisen. That such protective agencies exist in nature has been shewn recently by Northrup (5) in his work on the symbiosis of lactic acid organisms and certain yeasts.

Undoubtedly the power to grow at blood-heat temperature is also a wall of division which has, in many cases, to be overcome; but this difficulty is by no means so insurmountable as the difficulty of "acid" resistance. It is these difficulties which mark off B. coli in particular from many of the class of "root rot" organisms, which shew so many similarities to B. coli and also possess characteristics, which it has been found possible, in the course of these experiments, to produce in B. coli itself; such as, "slime" formation, filamentous growth etc., and when, as has been shewn by Johnston (6) and Giampietro (7), some of such "rots" are produced by typical B. coli, the above assumption begins to have a certain substratum of possibility.

References.

1. Revis, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1911. p. 1.
2. —, Proc. Roy. Soc. B. Vol. 85. 1912. p. 192.
3. —, Proc. Roy. Soc. B. Vol. 86. 1913. p. 373.
4. Eisenberg, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 63. 1912. p. 305.
5. Northrup, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. 1913. p. 459.
6. Johnston, U. S. Dept. of Agric. Bur. of Plant Ind. Bull. 228. 1912.
7. Giampietro, Riv. di Patol. Veg. Vol. 5. 1911. p. 29.

Nachdruck verboten.

Zur Frage nach den Beziehungen zwischen Bakterienflora der Milch und der Weide.

[Aus dem bakt. Labor. der Versuchsstation f. Molkereiwesen Kiel, Vorstand Prof. Dr. Weigmann.]

Von Dr. **A. Wolff.**

Untersuchungen über die Milchflora einerseits und die Organismenflora auf der Weide bzw. Pflanzen und grünen Futtermitteln andererseits liegen weit reichlicher vor (vergl. die Zusammenfassung von Weigmann in Lafars Handbuch der techn. Mykologie und Löhnis im Handbuch der landw. Bakteriologie) als Untersuchungen direkt über den Zusammenhang der Milch- und der Weideflora. Weigmann und seine Mitarbeiter veröffentlichten in der Arbeit über die Entstehung des Rübengeschmacks in der Butter (Landw. Jahrb. 1908) zugleich Untersuchungen über die Flora auf Futtermitteln und in Milch und zwar speziell im Abschnitt 2 Versuche über den Einfluß der Futtermittel auf die Pilz- und Bakterienflora der Milch und des Kotes der Milchtiere. Es zeigte sich ein Zusammenhang insofern, als die Milchflora von einer Futterzusammenstellung zur anderen eine andere war. Weitere derzeit im hiesigen Laboratorium von Th. Gruber ausgeführte Untersuchungen (veröffentlicht im Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1909) betreffen die Bakterienflora der Milch während der Stallfütterung und des Weideganges einschließlich der in Streu, Gras und Kot vorkommenden Mikroorganismen. Es nähern sich diese Untersuchungen unserem Thema noch mehr, und zwar kommen aus dieser Arbeit speziell die Versuche VI.—IX. in Vergleich, die im Monat Mai, Juni, Juli und September während Weideganges der Milchtiere ausgeführt wurden. Verf. hat, der Kernfrage seiner Untersuchungen nachgehend, mehr auf andere Gesichtspunkte Wert gelegt als auf die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Milchflora und Weide- bzw. Grasflora. Es seien daher die einschlägigen, speziell hier interessierenden Punkte herausgegriffen.

Wie gesagt, handelt es sich um die Versuche VI.—IX., die folgendes Resultat ergaben:

Versuch VI. · Weidegang. 30. Mai nachmittags.

Milch: 980 resp. 990 Keime auf Gelatine und Agar, überwiegend Bact. coli und aerogenes, sehr wenig Bact. erythrogenes, Bac. subtilis und Sarcina liquefaciens Frankland, vereinzelt Micrococcus No. 18 und Microc. pallidus H.

Gras: 71 000 resp. 175 000 Keime, sehr im Vordergrund Bact. aerogenes und coli, ferner Rosahefe, Bacterium No. 19, Fluorescens, Coccus No. 1, Microc. pallidus H., Pseudomonas No. 7, Sarcina liquefaciens F. und Bact. fulvum Mig.

Versuch VII. Weidegang. Mitte Juni.

Milch: 590 Keime, meistens Milchsäurebakterien, Microc. pallidus und Coccus No. 1, Sarcina liquefaciens und Bact. erythrogenes schwach vertreten.

Gras: 695 000 Gelatinekeime, als Hauptgruppen Torula 10 und Fluorescens, wenig Coccus No. 8 und No. 1, vereinzelt Milchsäurebakterien, Oidien und Schimmelpilze. 855 000 Agar-Keime und zwar Rosahefe und Coccus No. 18, vereinzelt Coccus No. 1, Fluorescens, Bacterium No. 6 und Microc. pallidus.

Versuch VIII. Weidegang. Mitte Juli.

Milch: 400 Keime und zwar Bacterium No. 21, Coccus No. 22, Micrococcus pallidus, vereinzelt Torula 10 und Streptothrix odorifera.

Gras: 397 000 Gelatine-, 680 000 Agar-Keime, hauptsächlich Bacterium No. 6, 23 und 25, und Rosahefe, weniger Fluorescens, Rosahefe und Coccus No. 18, ganz vereinzelt Microc. pallidus.

Versuch IX. Weidegang. Mitte September.

Milch: 375 bzw. 430 Keime, zu zwei Drittel Torula 10, ferner Microc. pallidus, Coccus No. 8, Oidium lactis, Bact. erythrogenes, Bac. mycoides und Bacterium No. 6.

Gras: 2 040 000 bzw. 2 380 000 Keime, hauptsächlich Fluorescens, daneben coli, Bac. mycoides, Bact. fulvum, Bact. erythrogenes, Bacterium No. 6 und die Rosahefe, vereinzelt eine braune Hefe und Bacterium No. 26; in der fluoreszierenden Gruppe auch Pseudomonas fluorescens aureus vertreten.

In diesen Versuchen zeigen Milch- und Grasflora gewisse Übereinstimmung den Arten, und zwar stehen im Versuch VI in beiden Medien die Coli-Aerogenes-Bakterien an der Spitze, ferner sind in beiden Fällen Micrococcus pallidus und Sarcina liquefaciens vertreten; bei der Nebenflora, die allerdings von Milch zu Gras wechselt, ist in Betracht zu ziehen, daß es sich nur um vereinzelt auftretende Organismen handelt. In Versuch VII werden in beiden Substraten Milchsäurebakterien konstatiert, auch in bezug auf die Kokken zeigt sich Übereinstimmung. Versuch VIII zeigt wenig Analogie. Im IX. Versuch hat sich in der Milch eine Torula breit gemacht, entsprechend sind auch im Gras Bakterium No. 6, Bac. mycoides und Bact. erythrogenes zu finden.

Es zeigen also diese Versuche in der Tat eine Übereinstimmung der Bakterienflora in der Milch einerseits und dem Gras andererseits. Auf Gras ist die fluoreszierende Gruppe stets vertreten, zuweilen steht sie sogar im Vordergrunde. Was in der Hauptsache die Verschiebung des Artenbildes von einem Versuch zum anderen anbetrifft, so ist nach der Stallfütterung beim ersten Weideversuch (VI), wie wir gesehen haben, Coli und Aerogenes in Milch und auf Gras vorherrschend. Nach den ersten Weideversuch verlieren diese beiden ersten Gruppen ihre vorherrschende Stellung, eine Torula drängt sich mehr in den Vordergrund, besonders in Milch, in Versuch VII besitzt Gras einen großen Teil dieser Torula, die sich bei den folgenden Versuchen VIII, IX in die Milch eingeschlichen hat, während letztere in der Weidegangperiode die sporulierenden Arten (Bazillen), die sich während der Stallfütterung derselben mitgeteilt haben, beinahe ganz verliert, um sie nach dem Weidegange wieder zu zeigen. Interessant ist auch die gleichzeitige Beobachtung der Keimzahl, die bei Weidegang bedeutend geringer wird.

Nachfolgend sollen weitere, im hiesigen Laboratorium gelegentlich einlaufender Honoraranalysen ausgeführte Untersuchungen und Beobachtungen, speziell also den Zusammenhang zwischen Mikroorganismenflora der Milch und der Weide betreffend, einen Beitrag zu der aufgeworfenen Frage liefern. Nächster Anlaß war die Untersuchung einer schlecht schmeckenden Milch, deren Fehler, nach der Vermutung des betreffenden Landmannes, von der Kuhweide herstammen konnte (30. VII. 1910 u. 3. VIII. 1910).

Die bakteriologische Analyse der Milch ergab, abgesehen von den Milchsäurebakterien auf Gelatineplatten, Agarplatten und in Milchzuckeragar-Schichtkultur, folgende Organismenarten:

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

1. Zahlreich ein Kurzstäbchen, das morphologisch und kulturell einem bereits früher in einer abnormal aufrahmenden Milch gefundenen und im Milchw. Zentralbl. 1909. p. 534 beschriebenen, in kleinen Gänseblümchenkolonien wachsenden ähnlich war, jedoch keine typischen Zooglöen bildete; Milch blieb längere Zeit hindurch unverändert, nach Wochen allerdings nahm der Nährboden ein speckiges Aussehen und eine schleimige, fadenziehende Beschaffenheit an.
2. Alkalibildende Kurzstäbchen.
3. Bacterium fluorescens.
4. Bacterium Zopfii.
5. Coli-Aerogenes.
6. Einen gelblichen, schwach verflüssigenden Coccus.
7. Ein verflüssigendes Stäbchen, plump, mit stark abgerundeten Enden, ca. 1 × 2—3 μ groß, ohne Sporen, ohne Gasbildung; auffallend war ein Aroma an Klee und Lupinenblüten erinnernd auf Peptonmolkengelatine.

Der Frage nachgehend, inwieweit diese Organismen von der Kuhweide stammen möchten, wurde von demselben Landmann neben einer nochmaligen Probe Milch auch eine Probe von den Weidepflanzen eingefordert.

In der Milchprobe hatten sich, wie die Analyse ergab, die unter 6 und 7 genannten Bakterien, wohl infolge sauberer Behandlung, verloren, im übrigen zeigte sich die gleiche Flora wie vorhin.

Von der Weide wurde eine Probe Klee von einem einjährigen Schlag und eine Probe Gras von einem zweijährigen Schlag untersucht. Die Kleeprobe einerseits und die Grasprobe andererseits zeigten die gleiche Flora. Ferner wurden auf den Weideproben die gleichen Organismenarten wie in der Milch gefunden, zudem allerdings ein zitronen- bzw. wachsgelbes Kurzstäbchen, ein rötlich-gelbes Kurzstäbchen und der Bacillus lactorubefaciens. Von den verschiedenen Arten stand auf der Weide Bact. fluorescens mehr im Vordergrund, in der Milch dagegen die Milchsäurebakterien.

Eine gewisse Übereinstimmung der Milch- und der Weideflora liegt also unverkennbar vor. Dies zeigen auch weitere Untersuchungen. Bevor aber auf diese eingegangen werden soll, wären die beiden letztgenannten Kurzstäbchen, die sich als besonders interessant herausstellten, näher zu charakterisieren.

Zunächst möge das wachs- bzw. zitronengelbe Kurzstäbchen (No. 826 d. Sam.) näher betrachtet werden. Es wurde zunächst mit Bacillus constrictus und Bac. subflavus (Zimmermann), ferner mit Bac. luteus (Flügge) verglichen. Mit diesen aber, wie auch mit den in Käseschmiere oft vertretenen zitronengelben Kurzstäbchen (cf. Milchw. Zentralbl. 1909. p. 148) war es nicht identisch. Mit weiteren aus der Sammlung entnommenen gelben Kurzstäbchen verglichen, stellte sich interessanterweise sehr nahe Verwandtschaft mit einem bereits im Jahre 1901 aus Rübenblättern gezüchteten (No. 301 d. Sam.) und einem 1904 aus Milch isolierten Stäbchen (No. 305 d. Sam.), die untereinander absolut identisch waren, heraus, allerdings war deren Bakterienbelag undurchscheinend, mehr zitronengelb und etwas kräftiger, auch wurde Gelatine langsamer verflüssigt; auf Kulturen war ein unangenehmer Geruch wahrnehmbar, auch in Milch. Es möge die kurze Charakteristik unseres Stäbchens hier folgen:

Morphologie: Im allgemeinen schlanke, an den Enden abgerundete Stäbchen, nicht sporenbildend, lebhaft beweglich (kreiselnd oder schwimmend), einzeln, seltener zu zweien: in der Länge wechselnd, auf Gelatine 0,7 × 1,5—3 μ groß, auf Agar 0,6—0,8 μ breit, verschieden lang, oft stark verkürzt, in Bouillon besonders lebhaft beweglich, im allgemeinen etwas länger, in Milch Wachstum nicht so gut, Zellen etwas größer, besonders groß auf Kartoffel.

Kulturelle Merkmale:

Gelatineplatten 20° C: langsames Wachstum. Kleine, anfangs gelbliche, später undeutlich zitronengelbe, flache Tröpfchen, die nach längerer Zeit den Nährboden schwach verflüssigen. Unter dem Mikroskop fein granulierte, scharf begrenzte Scheibchen. Die Kolonien bleiben relativ klein. Auf Pept. Molk. Gel. besseres Wachstum, hier aber keine Verflüssigung. Auch Farbstoffbildung geringer. Süßlicher Geruch, nicht unangenehm.

Agar-Platten 30° C: Größere, kreisrunde, zitronengelbe, glänzende Kolonien, die eine Größe bis zu ¾ mm im Durchmesser erreichen können, von flacher Form. Unter dem Mikroskop fein gekörnt, am Rande heller.

Gelatine-Stich 20° C: Nach 24 Stunden bereits glattes, nach unten zu nur ganz leicht sich ausspitzendes Wachstum, kleine rundliche wachsgelbe Auflagerung. Nach 5 Tagen beginnende Verflüssigung und zwar im oberen Teil des Stichkanals, später lochförmige Auflösung; Bakterienmasse samt der kleinen Auflagerung herabrutschend, nach 10 Tagen etwa bis zur Hälfte des Stichkanals.

Agar-Stich 30° C: Ähnlich wie Gel., rundliche, fast kreisrunde Auflagerung von flacher Tropfenform, nach einer Woche 3—4 mm im Durchmesser, grünlich-gelb, glänzend.

Agar-Strich 18 und 30° C: Schleimiger Belag von grünlich-gelber Farbe, durchscheinend, ziemlich flach, 3—4 mm breit, am Rande schwach gelappt. Bei 18° C schwächeres Wachstum. Süßlicher Geruch.

Milchzuckeragar-Schüttelkultur: Wachstum nur an der Oberfläche, keine Gasbildung.

Bouillon 30° C: Trübung, Flockenbildung, die sich am Boden ansammelt und eine gelbliche Färbung annimmt. Unangenehm süßlicher Geruch.

Kartoffel: Nach 24 Stunden bereits kräftiges Wachstum, schleimiger, gelber, herabfließender Belag, der weiterhin die Kartoffel, besonders am unteren Ende überzieht; die Kartoffel wird allmählich bräunlich verfärbt. Unangenehm süßer, zugleich etwas alkoholischer Geruch.

Milch 18 und 30° C: Bleibt, längere Zeit wenigstens, unverändert; keine deutliche Reaktion, später hellgelbe Ringbildung an der Oberfläche und hellgelber Bodensatz. Ganz schwacher, aber scharfer Geruch; unangenehmer, bitterlicher Geschmack. Nach längerer Zeit schwache Aufhellung des Nährbodens.

Bei weiterem Vergleich dieses Stäbchens mit Organismen der Sammlung stellte sich die interessante Tatsache heraus, daß es auch identisch mit einem Stäbchen (No. 775 d. Sam.) war, das seinerzeit als Ursache bitterer Milch in großer Menge in dem zur Verfütterung gelangenden Bohnenschrot gefunden wurde (11. IV. 1909), und da es, wie wir gesehen haben, in der Milch ebenfalls einen unangenehmen, bitterlichen Geschmack erzeugte, so dürfte es mit Recht mit der zuvor erwähnten fehlerhaften Erscheinung der zur Untersuchung eingesandten Milchprobe in Zusammenhang zu bringen sein. Ein Vergleich dieser beiden Stäbchen (No. 826 u. 775 d. Sam.), nebeneinander gezüchtet, ergab folgendes:

Die Zellform war die gleiche, auch bei letzterem Stäbchen bildeten sich auf Kartoffel besonders große, klare Formen, 1,2 μ breit, meistens 2—3 μ lang, selten länger, an den Enden stark abgerundet bis zugespitzt und dadurch nahezu Clostridien-ähnlich. Auf den übrigen Nährböden zeigten sich reguläre Stäbchen, in beiden Fällen von gleicher Form und Größe. In Milch war das Wachstum in beiden Fällen ein ziemlich schlechtes. Kulturell zeigte sich ebenfalls Übereinstimmung.

Auf Agar-Platten entstanden gleichfalls grünlich-gelbe, durchscheinende Kolonien, flache, glänzende Tröpfchen von weicher Konsistenz, rund oder rundlich, ganzrandig; auf Gelatine-Platten nach 48 Stunden mikroskopisch kleine, rundliche, scharf begrenzte Scheibchen. Hier zuweilen von unregelmäßiger Gestalt und den Nährboden innerhalb 10 Tagen nicht verflüssigend.

Gelatine-Stich: Glattes Wachstum im gesamten Stichkanal, winzig kleine Auflagerung, die später gelappt; keine deutliche Verflüssigung.

Agar-Stich: In beiden Fällen Wachstum im gesamten Stichkanal, nur ganz wenig spärlicher am unteren Ende, flache, grünlich-gelbe, glänzende, durchscheinende Auflagerung, nach 48 Stunden rundlich, 3—4 mm im Durchmesser, später größer, am Rande schwach gelappt.

Agar-Strich: Bei 18° C dünner, erhabener, gelblicher, ganzrandiger Belag, nach 48 Stunden 1,5 mm breit, bei 30° C kräftiger, 2—3 mm breit, intensiv grünlichgelb gefärbt, durchscheinend, zugleich undeutlich fluoreszierend.

Auch Bouillon und Schüttelkultur ergab ein genau gleiches Bild.

Auf Kartoffel zeigte sich nach 48 Stunden ein dünner, leuchtend gelber, glänzender Belag, der hier auf die Impffläche beschränkt blieb.

In jungen Milchkulturen erzeugten beide deutlich einen eigentümlichen Geruch, etwa nach Rüben und einen auffallend süßen, dann aber stark nachbitternden Geschmack, keine deutliche Reaktion auf Lackmus.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß es sich um ein und denselben Organismus handelt, nur ist ersterer ein physiologisch etwas kräftigerer Stamm, wie sich Gelatine und Milch gegenüber erkenenn läßt. Ein besonderes Interesse erhält dieser Organismus durch seine Eigenschaft, Milch einen bitteren Geschmack zu verleihen.

Nach weiterer Nachforschung ergab sich schließlich, daß unser Stäbchen mit No. 620 der Sammlung und somit mit der von Huss in vorliegender Zeitschrift Bd. 19. 1907. p. 68, sehr ausführlich beschriebenen Pseudomonas trifolii identisch war. Nach Huss steht Pseudomonas trifolii, Pseudomonas campestris (Pammel) Smith [Bac. campestris (Pammel), der jedoch sehr kurz beschrieben ist], am nächsten, die eine Pflanzenkrankheit hervorrufen soll; auch zeigt sich Ähnlichkeit mit dem Bacterium ochrarcum (Zimm.) L. et N. Beide Organismen wurden wieder nebeneinander gezüchtet. Riechstoffe wurden auch von unserem Stamme gebildet, zwar wurde ein deutlicher Heugeruch vermißt, doch wechselt bekanntlich eine derartige Eigenschaft, und zwar wahrscheinlich mit dem Standort der Bakterie; andererseits dürfte die Fähigkeit, unter gewissen Umständen aromatische Körper zu produzieren, in höherem oder geringerem Grade wohl jeder Bakterie zukommen (cf. Weigmann und Wolff in den Landw. Jahrb. 1913). Im übrigen zeigte sich genaue Übereinstimmung. Es sei mir erlaubt, diese Bakterie kurzerhand als Bacterium trifolii zu bezeichnen, in gleicher Weise hat sich ja auch die Bezeichnung Pseudomonas coli für Bacterium coli nicht eingeführt.

Weiterhin wurde das Bacterium trifolii wiederholt, sogar recht oft, auf Gras, Heu, Getreideschrot, andererseits auch in Milch gefunden. Dies spricht für eine weite Verbreitung der Bakterie und gleichzeitig dafür, daß sie nicht selten von der Weide wie von Futtermitteln überhaupt in die Milch gelangt. Gelingt es dann dem Bakterium in Ausnutzung irgendwie günstiger Verhältnisse, z. B. geeigneter Temperatur oder eventuell Mangel an Milchsäurebakterien in der Milch die Vorherrschaft zu erlangen, so entsteht ein Fall von bitterer Milch.

Ein weiterer (am 2. I. 1911 beobachteter) Fall, der dies illustrierte, sei hier kurz erwähnt: Es wurde uns eine Probe bitterer Milch eingesandt mit der Vermutung, daß dieser Fehler der Verabreichung von Kraftfutter, speziell Erdnußmehl zuzuschreiben wäre. Zugleich mit der Einforderung einer einwandfrei gefaßten neuen Milchprobe wurden daher Proben des verfütterten

Kraftfutters einverlangt und zwar das Erdnußmehl, wie auch Maismehl und Maismehl + Melasse. In der Milchprobe wurde abgesehen von den, Milchsäurebakterien, die jedenfalls nicht zahlreich vertreten waren, Bact. fluorescens, Coli-Aerogenes, ein gelber und ein weißer Coccus, eine Sarcine, ein Oidium und reichlich ein Stäbchen in grünlich-gelben bzw. wachsfarbenen, flachen Tröpfchenkolonien gefunden. Diese letzteren erzeugten in Milch einen scharf bitteren Geschmack, der an den in der Originalmilch beobachteten unbedingt erinnerte, jedoch intensiver und reiner war. Von den Kraftfuttermitteln enthielt das Erdnußmehl derartige Stäbchen in weit vorwiegender Zahl, daneben einen weißen Aktinomyceten, Bac. vulgatus und einen hefeähnlichen Pilz. Das Maismehl zeigte wenig Keime, und zwar ein indifferentes weißes Kurzstäbchen, einen Kokkus, einen Aktinomyceten, Bac. mesentericus und einen Schimmelpilz; das gelbe Stäbchen war nicht vorhanden. Maismehl + Melasse enthielt fast ausschließlich gelbe und weiße verflüssigende und nicht verflüssigende Kokken, auch hier war das gelbe Stäbchen nicht vertreten.

Weiter wurde das aus Milch einerseits und das aus Erdnußmehl andererseits isolierte gelbe Stäbchen nebeneinander gezüchtet. Sie stellten sich als unbedingt identisch heraus. So war bewiesen, daß die Milch durch das Erdnußkuchenmehl mit dem gelben Stäbchen infiziert wurde; ferner, daß dieses als die Ursache des bitteren Geschmackes in der Milch anzusprechen war, unterstützt vielleicht durch das gleichzeitig anwesende Bact. fluorescens liquefaciens. Alsdann wurde das gelbe Stäbchen als identisch mit Bact. trifolii konstatiert.

Es ist dies ein neuer Beweis dafür, daß das Bact. trifolii in gewissen Fällen als Ursache bitterer Milch auftritt, daß es in der Natur, speziell auf Futtermitteln, stark verbreitet ist und oftmals von dort die Milch infiziert. Ebenso kann das Bact. trifolii natürlich auch von der Weide in die Milch gelangen.

Wie zuvor erwähnt, wurde in der untersuchten Klee- und Grasprobe neben dem Bact. trifolii auch ein rötlich-gelbes Kurzstäbchen gefunden, das ebenfalls näher charakterisiert werden sollte. Es stellte sich als nahe verwandt mit dem gelegentlich früherer Untersuchungen von Klee, Gras und Schafgarbe beobachteten (Milchw. Zentralbl. 1909. Heft 2. p. 70), später auch in abnormal schmeckender Milch und Quark (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 24. 1909. p. 371) gefundenen und an letzterer Stelle beschriebenen Organismus heraus.

Was die Zellform anbetrifft, so war an zitierter Stelle kurz gesagt: im allgemeinen 1 μ groß. Ein Vergleich beider Organismen nebeneinander ergab folgenden Befund: erstgefundenes Kurzstäbchen war auf Agar ca. 0,8×1,3 μ groß, vorliegendes 0,5×1,5 μ, auf Gelatine 0,8×1,5 μ resp. 0,5×1,5 μ, in Milch 0,8×1,3—1,5 resp. 0,5×2 μ und länger. — Beides sind nicht sporenbildende, an den Enden schwach abgerundete Stäbchen, meistens einzeln auftretend, das erstgenannte im allgemeinen etwas kürzer und dicker.

Eigenbewegung wurde bei ersterem nicht gesehen, während letzteres eigenbeweglich war, indem sich hier und dort eine Zelle, meistens kreiselnd, schnell fortbewegte.

Kulturell verhielten sich beide Organismen nebeneinander gezüchtet gleich. Ergänzend zu der (l. c.) gegebenen Beschreibung möge hier erwähnt sein, daß Agarstrichkulturen (bei 18 und 30° C) nach 48 Stunden einen 1—2 mm breiten, ziemlich hohen, mattglänzenden Belag von gelblichweißer Farbe bildeten, der später rötlich-gelb und kräftiger wurde. Milch blieb längere Zeit hindurch unverändert, ohne deutliche Reaktion, wies aber deutlich einen unreinen Geruch nach „kuhwarmer Milch“ auf; später zeigte sich gelbliche Ringbildung an der Oberfläche und rotgelber Bodensatz; nach weiterem Aufbewahren erschien die Milch aufgehellt.

Bei der derzeitigen Beschreibung des rotgelben Kurzstäbchens (l. c.) wurde gesagt, daß es an „Bacillus“ fulvus Zimmermann bzw. Bact. fulvum (Zimmermann) L. et N. erinnert. Nun ist aber bis auf die letzthin beobachtete Beweglichkeit kein Unterschied zwischen jenem und dem jetzt gefundenen Stäbchen zu konstatieren. Lehmann und Neumann sagen nach eingehender Prüfung in ihrem Handatlas, daß Bact. chrysogloea Zopf nach der Beschreibung von Zimmermann nur durch lebhafte Eigenbewegung von Bact. fulvum zu unterscheiden sei, chrysogloea und fulvum dürften als Formen mobilis und immobilis zusammengehören. Unser Befund dürfte ein Beweis dafür sein, und ist unser Kurzstäbchen mit Bact. fulvum (Zimmermann), sowie mit Bact. chrysogloea (Zopf) Zimmermann als identisch zu erklären. Migula führt Bact. chrysogloea bei den unbeweglichen Arten an und bezeichnet Bact. aureum Frankland, Bact. aurescens Frankland, Bact. egregium Zopf als sehr nahe verwandt. Nach diesem erscheint also stets ein und dieselbe Art vorzuliegen, bei der die Eigenschaft der Beweglichkeit schwankt, bzw. nicht immer zu beobachten ist, deshalb dürfte zweckmäßig die älteste Bezeichnung Bact. fulvum (Zimmermann) für dieses rötlich-gelbe Kurzstäbchen beizubehalten sein.

Es erinnert dieses Stäbchen auch lebhaft an das Bact. herbicola aureum (Burri et Düggeli), das ebenfalls auf Pflanzen gefunden wurde und an Samen, Blättern, Stengeln, Keimpflanzen enorm verbreitet ist.

Um der Bakterienflora auf der Weide weiter nachzugehen, wurden durch den gleichen Landmann, Proben aus der Nachbarschaft eingefordert. Probe I war Klee in Blüte, Probe II Gras mit wenig Kleegehalt, Probe III Klee und Gras.

Die Proben wurden mit sterilem Wasser abgeschwämmt und mit steriler Pipette (1, $\frac{1}{2}$ und $^{1}/_{10}$ ccm) auf Gelatine-Agarplatten und Milchzuckeragarschicht geimpft.

Abgesehen von der gewöhnlichen Milchsäurebakterie und dem kleinen, bereits auch früher gefundenen Kurzstäbchen in Gänseblümchenkolonien (No. 777 d. Sam.), das Milch gegenüber sich indifferent verhielt, wurden gefunden in:

Probe I: 30% Bact. fluorescens liquefaciens,
20% Aerogenes,
10% Coli-ähnliche,
20% alkalibildende Kurzstäbchen,
10% Bact. trifolii und
10% des rötlich-gelben, Bact. fulvum-ähnlichen Kurzstäbchens.

Probe II: Ähnliche Flora wie in Probe I, jedoch reichlicher Bact. fluorescens (40%).

Probe III: Flora wie auf Probe I, jedoch außer mehr Individuen von Bact. fluorescens, ein etwas stärkeres Hervortreten der bei I an beiden letzten Stellen genannten Farbstoffbildner, ferner Bact. lactorubefaciens und ein kleines, schleimbildendes Kurzstäbchen, 0,4×1,5 μ groß, an den

Enden etwas zugespitzt und so an die gewöhnliche Milchsäurebakterie erinnernd, jedoch meistens einzeln, selten zu zweien, nie in Kettchen; lebhaft beweglich, aërob, ohne Sporen, ohne Gasbildungsvermögen. Kolonien tröpfchenförmig, Bakterienmasse undurchscheinend, weiß, fettglänzend; in Bouillon fauliger Geruch, Kartoffel bräunlich verfärbt, in Milch äußerlich zunächst keine Veränderung, Ringbildung an der Oberfläche; eigentümlicher, etwa an Käse erinnernder Geruch, Reaktion schwach sauer, Konsistenz auffallend fadenziehend.

Auch hier also beobachten wir Übereinstimmung einmal bei den drei untersuchten Weideproben unter sich, dann dieser mit den zuvor untersuchten beiden Weideproben und Übereinstimmung in der Flora der Milch und der Weide. Dabei macht sich ein starkes Hervortreten von Bact. fluorescens auf der Weide bemerkbar. Auch die Coli-Aerogenes-Gruppe ist auf der Weide stärker vertreten wie in der Milch. Eine Verschiebung der Arten dürfte aber auf die Verschiedenheit des Nährsubstrates zurückzuführen sein. Wenn es sich auch bei der konstatierten Übereinstimmung zum Teil um allgemein verbreitete Arten handelt, so ist eine solche doch immerhin zu konstatieren, zum anderen Teil dürften die beobachteten, in blütenförmigen Kolonien wachsenden Kurzstäbchen und vor allem das Bact. trifolii als spezifische Organismen gelten können.

In anderen Fällen (3. I. 1913 u. 17. I. 1913) wurde in gleicher Art Übereinstimmung der Flora auf Heu, Haferstroh und Kraftfutter einerseits und Milch andererseits konstatiert, allerdings wiederum unter Verschiebung in der Zahl der Arten. Als Leitorganismus fiel Bact. trifolii auf.

Das Bact. trifolii wurde nachfolgend bei gelegentlichen Analysen wiederholt auf Futtermitteln bzw. Weidepflanzen und recht oft in der Milch gefunden; so konnte es auch in einer Milch aus Schlesien stammend, die von Zeit zu Zeit (im Winter 1911) vom Institut untersucht wurde, beobachtet werden. Sehr stark war es auf einem der Qualität nach guten Wiesenheu, eingesandt von einem Landmann der Provinz (15. V. 1912 u. 13. VII. 1912), vertreten, weniger auf der gleichzeitig übersandten Probe eines sauren Heus; hier fand sich Bact. fluorescens liquefaciens weit zahlreicher neben Aktinomyces vor. In Gras und Heu aus Wilster stammend (18. VII. 1912) war sowohl Bact. trifolii, wie auch das zuvor beschriebene rötlich-gelbe Kurzstäbchen, das als Rasse von Bact. fulvum aufzufassen ist, reichlich vorhanden. Wiederholt wurde im Sommer in Milch und auf Futter auch das in kleinen blütenförmigen Kolonien wachsende Kurzstäbchen gefunden. Zuletzt wurde das Bact. trifolii in „futterig“ schmeckender Milch und zugleich in dem verfütterten Gerstenschrot, allerdings nicht als alleinige Ursache dieses Fehlers, konstatiert.

Das Mitgeteilte zeigt, in welcher Weise ein Zusammenhang zwischen Weide- und Milchflora besteht; es ist eine Übereinstimmung im Auftreten allgemein verbreiteter Keime zu konstatieren, dann aber auch kann man gewisse Bakterien, wie das Bact. trifolii, ferner die Rasse des Bact. fulvum bzw. Bact. herbicola, dann das in Gänseblümchenkolonien wachsende Kurzstäbchen und wohl auch das Bact. lactorubefaciens (Bac. lactorubefaciens) als spezifische Organismen beider Medien bzw. als spezifische Organismen der Weide, die zur Weidezeit nicht selten in die Milch gelangen, auffassen. Dieser Zusammenhang bzw. diese Übereinstimmung in Weide- und Milchflora wird natürlich von der jeweiligen sauberen Behandlung der Milch, speziell des Euters abhängen. Im Vergleich hierzu sind die Beziehungen zwischen Milchflora und Futterflora im Stalle nach Weigmann (Mykologie der Milch p. 104) nur geringe, denn die Milch bei verschiedener Fütterungsweise enthält keineswegs immer die Bakterien des Futters. Es besteht also kein so enger Zusammenhang zwischen Milchbakterien und Futter, wie man annehmen sollte, wenigstens besteht er da nicht in stärkerem Maße, wo die Stallhaltung eine reinliche ist. Insofern ist er aber immerhin vorhanden, als gewisse Bakterienarten, die aus dem Futter bestimmte Geruchs- und Geschmacksstoffe angenommen haben, dabei doch in die Milch gelangen, sei es, weil die Stallhaltung eben doch keine genügend reinliche ist oder die Art des Futters einen weichen bis flüssigen Kot und dadurch leichter Verunreinigung verursacht, sei es, daß sie durch den Futterstaub usw. dahin gelangen. Enger als der Zusammenhang zwischen Milchflora und Futterflora im Stalle ist der Zusammenhang zwischen Milchflora und Einstreu, weil die Tiere bzw. deren Euter mit dieser Unterlage recht oft und ausgiebig in Berührung kommen. Ähnlich aber liegen die Verhältnisse auf der Weide, insofern diese ja gleichzeitig auch Unterlage für die fressenden Tiere bildet; daraus läßt sich der engere Zusammenhang auch zwischen Milchflora und Weideflora erklären.

Nachdruck verboten.

Über den Einfluß der Böden und des Wassergehaltes auf die Stickstoffumsetzungen.[1]

[Mitteilung aus der agrikulturchem. Versuchsstation in Halle a. S.]

Von **F. Münter** (Ref.) u. **W. P. Robson.**

Von den Stickstoffumsetzungen im Boden ist im hohen Grade das Wachstum unserer Kulturpflanzen und damit die Produktion abhängig. Es ist daher eine wichtige Aufgabe, die verschiedenen Stickstoffumsetzungen zu studieren. In vorliegender Arbeit sollte versucht werden, festzustellen, wie die Umsetzungen der Stickstofformen in verschiedenen Böden mit verschiedenem Wassergehalt verlaufen. Daher kamen folgende Fragen zur Untersuchung:

1. Wie verhält sich organischer Stickstoffdünger in verschiedenen Böden mit verschiedenem Wassergehalt?
2. Wie gehen unter denselben Verhältnissen Ammonsulfatumsetzungen vor sich?
3. Unter welchen Bedingungen und zu welcher Zeit tritt die günstigste Salpeterbildung ein?
4. Bei welchen Feuchtigkeitsgraden entstehen Stickstoffverluste?
5. Welchen Einfluß üben organische Kohlenstoffquellen auf die Stickstoffumsetzungen aus und zwar bei Zusatz von Salpeter und Ammonsulfat?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Topfversuche gewählt, bei welchen eine bestimmte Menge Erde in Vegetationsgefäßen lagerte. Um äußere Einflüsse zu beschränken, ließen wir die Versuche nicht im Freien, sondern im bakteriologischen Laboratorium, in welchem nicht chemisch gearbeitet wurde, stehen. Natürlich muß man sich hüten, die Ergebnisse direkt auf das freie Land übertragen zu wollen. Fehlte es doch den Lagerorten an jeglichem Sonnenschein und wegen des gleichmäßigen Wassergehaltes auch an Austrocknung. Daher mag wohl der Tonboden manchmal etwas bessere Ergebnisse geliefert haben, als man von diesen Böden gewohnt ist. Ebenso ist eine Gabe von 2,8 g N pro Topf, welche einer Düngung von ca. 29 Zentnern Salpeter pro Morgen entsprechen würde, für die Landwirtschaft unbrauchbar. Sie wurde aber gewählt, um die Reaktionen nicht zu schnell beenden zu lassen.

---

[1] Bearbeitung der Inaugural-Dissertation von W. P. Robson. Halle a. S. 1913.

Der erste Teil der Versuche wurde nach folgendem Plane ausgeführt:

Drei verschiedene Böden mit niedrigem, mittlerem und hohem Wassergehalt, 1. ohne Düngung, 2. mit Ammoniumsulfat, 3. mit Hornmehl. Für den Sandboden kamen 6, 12 und 18 Proz., für den Lehmboden 8, 16 und 24 Proz. und für den Tonboden 8, 18 und 28 Proz. Wasser in der Erde in Betracht. Die drei Böden, welche bei unseren Untersuchungen benutzt wurden, waren Sandboden des Versuchsfeldes von Gr. Lübars bei Magdeburg, Lösslehmboden, von dem Lauchstädter Versuchsfelde und Tonboden des Gutes Gimritz bei Halle a. d. Saale. Sie zeigen folgende Zusammensetzung:

Mechanische Analyse.

	Sandboden %	Lehmboden %	Tonboden %
Abschlämmbare Teile . .	5,2	26,0	51,6
Staubsand	12,5	68,8	41,8
Feinsand	10,7	4,2	2,7
Grobsand	70,3	0,8	2,9
Kies	1,3	0,2	1,0

Chemische Analyse.

	Sandboden %	Lehmboden %	Tonboden %
P_2O_5	0,07	0,09	0,14
K_2O	0,09	0,33	0,31
CaO	0,19	0,74	0,97
MgO	0,07	0,54	1,15

Die Anfangsbestimmungen ergaben folgende Stickstoffzahlen pro 100 g Trockenerde:

	Sandboden g N	Lehmboden g N	Tonboden g N
Salpeterstickstoff	0,00103	0,00654	0,00152
Wasserlöslicher Ammonstickstoff .	0,00000	0,00000	0,00000
Gesamtammonstickstoff	0,00057	0,00119	0,00044
Gesamtstickstoff	0,09148	0,15977	0,17223

Für jeden Topf, aus glasiertem Steingut, 26 cm hoch, mit 20 cm innerem Durchmesser, wurden 7 kg trockener Erde benutzt und folgende Gefäße angesetzt:

Zwei Töpfe mit Sandboden ohne Düngung zu 6, 12 und 18 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Sandboden und 2,8 g Stickstoff als Ammoniumsulfat bei 6, 12 und 18 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Sandboden und 2,8 g Stickstoff als Hornmehl bei 6, 12 und 18 Proz. Wasser, zwei Töpfe mit Lehmboden ohne Düngung bei 8, 16 und 24 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Lehmboden und 2,8 g Stickstoff als Ammoniumsulfat bei 8, 16 und 24 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Lehmboden und 2,8 g Stickstoff als Hornmehl bei 8, 16 und 24 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Tonboden ohne Düngung bei 8, 18 und 28 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Tonboden und 2,8 g Stickstoff als Ammoniumsulfat bei 8, 18 und 28 Proz. Wasser,

zwei Töpfe mit Tonboden und 2,8 g Stickstoff als Hornmehl bei 8, 18 und 28 Proz. Wasser.

Diese abgewogenen Erdmengen wurden in einer großen Schale mit dem Dünger vermischt, in die Töpfe gegeben und so viel destilliertes Wasser zugesetzt, bis die Gefäße die gewünschte Feuchtigkeit enthielten. Die Kontrollierung des Wassergehaltes geschah zweimal wöchentlich. Etwa verdunstete Feuchtigekit wurde durch Hinzufügen destillierten Wassers ersetzt.

Düngung: Den zur Düngung bestimmten Gefäßen wurden 13,333 g Ammoniumsulfat (21,0 Proz. N) beigegeben, was 2,8 g Ammonstickstoff pro Topf oder 0,04 g N für 100 g Trockenerde entspricht. Da das Hornmehl 12,10 Proz. Gesamtstickstoff, 0,4134 Proz. Gesamt-Ammonstickstoff, 0,3392 Proz. wasserlöslichen Ammonstickstoff und 0,2631 Proz. Nitratstickstoff enthielt, wurden durch eine Zugabe von 23,14 g jedem Topf nur 2,6434 g organisch gebundener Stickstoff beigefügt [2,8 g Gesamtstickstoff — (0,0957 g Ammonstickstoff + 0,0609 g Salpeterstickstoff)].

Die Versuche wurden am 13. Mai 1912 angesetzt und die Erden nach 3, 6 und 12 Wochen untersucht. Von jedem Boden sollten wasserlöslicher Ammonstickstoff, Gesamtammonstickstoff, Salpeterstickstoff und Gesamtstickstoff bestimmt werden. Die Gesamtstickstoffbestimmung nach 6 Wochen unterblieb. Für die Untersuchungen wurden jedem Topfe, nach vorherigem Durchmischen des Bodens, genau 2 × 600 g Erde für die Bestimmung des wasserlöslichen Ammoniaks und Salpeters entnommen, 2 × 150 g Erde für die Gesamtstickstoffanalyse und 150 g zur Gesamtammoniak- und Wasserbestimmung.

Der zurückgebliebene Gefäßinhalt wurde wieder auf die verlangte Feuchtigkeit gebracht.

Die angewandten Methoden der Analyse waren folgende:

Wasserlöslicher Ammonstickstoff: 600 g Erde wurden in einen 1 l-Kolben gewogen, 600 ccm Wasser mit 3 g stickstoffreiem Kochsalz hinzugefügt und das Ganze 20 Minuten lang in einer Maschine ausgeschüttelt. Darauf wurde die Mischung in ein großes Gefäß gegeben, nach Absetzen die klare Flüssigkeit mit einer Pipette aufgesogen und filtriert. 50 ccm der Flüssigkeit wurden mit genügend Magnesiumoxyd fast bis zur Trockne destilliert.

Zur Titration wurde Natronlauge, 1 ccm entsprach im allgemeinen 0,00055 g Stickstoff, benutzt. Als Indikator diente Kongorot.

Salpeterbestimmung: Zu dem im Kolben nach Destillation des wasserl. Ammons zurückgebliebenen Inhalt wurden 150 ccm Wasser ca. je 1,5 g Zink und Eisenstaub, sowie die nötige Menge konzentrierter Natronlauge zugegeben. Eine Beigabe von Paraffin verhinderte das Aufschäumen beim Kochen.

Die Reduktion in der Kälte dauerte einige Stunden, worauf das entstandene Ammoniak in 35 Minuten abdestilliert und bestimmt wurde.

Gesamtammonstickstoff: 25 g Erde wurden in einen Kochkolben gegeben, 60 ccm Wasser zugesetzt, mit genügend Magnesiumoxyd destilliert und das übergetriebene Ammoniak durch Titration wie gewöhnlich festgestellt.

Gesamtstickstoff: Die in weithalsige Glasflaschen gebrachten 150 g Erde wurden zur Vermeidung von Ammoniakverlusten mit verdünnter Weinsäurelösung gleichmäßig durchfeuchtet, in einem Trockenschrank bei 105° C 12 Stunden stehen gelassen und nach Erkalten zu feinem Pulver gemahlen. Von diesen Böden wurden 25 g in einem Jenenserkolben mit 30 ccm Phenolschwefelsäure (1 l Schwefelsäure, 40 g Phenol und 152 g Phosphorsäureanhydrid) gut gemischt, nach einigem Kühlen 3 g Zinkstaub portionsweise unter Umschütteln hinzugefügt und 2—3 Stunden in fließendem Wasser zur Reduktion stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde unter Zugabe von 45 ccm reiner Schwefelsäure und 2 Tropfen Quecksilber der Inhalt aufgeschlossen. Sobald die Schwefelsäurelösung erkaltet war, wurde sie in einen ½ l-Kolben übergespült, gekühlt, bis zur Marke aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und filtriert. Von dieser Flüssigkeit kamen 100 ccm mit 125 ccm konzentrierter Schwefelkalium-Natronlauge (11½ l Natronlauge vom spezifischen Gewicht 1,375 + 350 g Schwefelkalium in 2 l Wasser gelöst) zur Destillation.

Sämtliche Destillationen wurden unter Wasserkühlung vorgenommen und zur Kontrollierung der Lösungen immer blinde Bestimmungen angesetzt.

Von Salpeter-, wasserlöslichem Ammon- und Gesamtammonstickstoff wurden aus jedem Topfe zwei Bestimmungen gemacht. Für den Gesamtstickstoff kamen von jeder Erde zwei Proben doppelt zur Untersuchung, so daß also vier Bestimmungen ausgeführt wurden. Lagen die Titrationen zweier Bestimmungen derselben Probe mehr als $^4/_{10}$ ccm Natronlauge auseinander, so wurden die Analysen wiederholt.

Die ausgeführten Analysenergebnisse mögen in der Dissertation nachgesehen werden.

I. Stickstoffumsetzungen in Böden mit verschiedenem Wassergehalt ohne organische Substanz.

A. Zersetzungen organischer Stickstoffverbindungen.

Die Streitfrage, ob höhere Pflanzen organisch gebundenen Stickstoff aufnehmen können, hat für unsere Versuche eine untergeordnete Bedeutung. Bei normaler Ernährungsweise findet wohl nur ausnahmsweise eine Aufnahme des Stickstoffs in nicht mineralischer Form statt. Außerdem geht die Umsetzung organischer Stickstoffverbindungen durch Bakterien in Ammonstickstoff und Salpeter meist so schnell vor sich, daß die Pflanzen die leichter aufnehmbaren Formen bevorzugen werden. Wie weit eine Zersetzung auf chemischem oder physikalischem Wege im Boden möglich ist, sei dahingestellt, jedenfalls scheint sie nicht beträchtlich zu sein. So zeigte nach Müntz und Coudon ein sterilisierter Boden innerhalb 2½ Jahren keine Spur von Ammoniak, während derselbe Boden nicht sterilisiert in 67 Tagen eine Zunahme von 40—110 mg Ammoniak in 100 g Erde aufwies.

Daß die Intensität der Stickstoffumsetzungen in den verschiedenen Bodenarten ungleich vor sich geht, ferner zum Teil vom Wassergehalt abhängig ist, werden auch wieder unsere Versuche zeigen. Ebenso sind natürlich die einzelnen organischen Verbindungen ungleich angreifbar.

Betrachten wir das Verhalten des organisch gebundenen Stickstoffs in unseren Versuchen:

1. Bestimmung des unzersetzten organischen Stickstoffs.

Derselbe wurde durch folgende Berechnung festgestellt. Von dem zugesetzten organischen Stickstoff wurden der gefundene Ammonstickstoff (abzüglich Ammonstickstoff im Hornmehl und in den dazugehörigen Töpfen ohne Zusatz von organischer Substanz) + Salpeterstickstoff (abzüglich Salpeterstickstoff im Hornmehl und den hornmehlfreien Töpfen) + Gesamtstickstoffverlust (abzüglich Stickstoffverlust in den behandelten Töpfen) abgezogen. Ein ausgeführtes Beispiel der Berechnung möge in der Dissertation selbst nachgesehen werden.

Sandboden.

Abnahme der organischen Substanz.

Anzahl Wochen	Wassergehalt %	Gef. org. N Mittel g pro Topf	Abnahme g N	Abnahme %
0		2,64343	0,00000	0
3	6	1,40470	1,23873	46,86
12		0,94045	1,70298	64,42
3	12	1,44970	1,19373	45,15
12		1,04370	1,59973	60,52
3	18	1,59880	1,04463	39,52
12		0,97890	1,71453	64,86

Ein Einfluß des Wassergehaltes auf die Umsetzung des organisch gebundenen Stickstoffs tritt nicht hervor. Die Schnelligkeit der Zersetzung erreicht ihr Maximum bereits innerhalb der ersten 3 Wochen. Nach 12 Wochen steigt die Abnahme des zugesetzten organischen Stickstoffs auf ca. 65 Proz.

Einen größeren Einfluß auf den Zersetzungsprozeß zeigt der Wassergehalt im Lehmboden.

Lehmboden.

Abnahme der organischen Stickstoffsubstanz.

Anzahl Wochen	Wassergehalt %	Gef. org. N Mittel g pro Topf	Abnahme g N	Abnahme %
0		2,64343	0,00000	0
3	8	2,13467	0,50876	19,24
12		1,21423	1,42920	54,06
3	16	1,40524	1,23819	46,84
12		1,00457	1,63886	61,99
3	24	1,52795	1,11548	42,19
12		0,77417	1,86926	70,71

Während in der mäßig feucht gehaltenen Erde die Abnahme der organischen Stickstoffsubstanz in 3 Wochen kaum 20 Proz. betrug, erreichte sie bei den höheren Feuchtigkeitsgraden über die doppelte Höhe. Auch hier trat die größte Umsetzungsintensität innerhalb der ersten 3 Wochen ein. Immerhin erreichte sie bis zum Schluß des Versuches beim trockenen Boden 54 Proz. der zugesetzten Stickstoffmenge, während der höchste Wassergehalt die größte Zersetzungsfähigkeit mit 70,71 Proz. zeigte.

Tonboden.

Abnahme der organischen Stickstoffsubstanz.

Anzahl Wochen	Wassergehalt %	Gef. org. N Mittel g pro Topf	Abnahme g N	Abnahme %
0		2,64343	0,00000	0
3	8	2,62681	0,01662	0,63
12		2,29050	0,35293	13,35
3	18	1,82920	0,81423	30,80
12		0,97232	1,67111	63,21
3	29	1,68225	0,96118	36,36
12		1,11164	1,53179	57,94

Noch stärker ist der Einfluß des Wassergehaltes im Tonboden wahrnehmbar. Während in der trockenen Erde selbst nach 12 Wochen die Abnahme noch gering ist, beträgt sie bei den höheren Feuchtigkeitsgraden nach 3 Wochen bereits ca. 30 Proz., um im Laufe der weiteren Versuchsdauer auf 63 Proz. zu steigen. Damit ist allerdings scheinbar nicht die Höhe der Zersetzungsfähigkeit erreicht.

Während also bei mittlerem und höchstem Wassergehalt die Abnahme der organischen Stickstoffsubstanz in allen drei Böden am Ende des Versuches fast die gleiche Höhe erreicht hatte, zeigte innerhalb der ersten drei Wochen der Tonboden eine gewisse Umsetzungsträgheit, die vor allem bei dem niederen Wassergehalt zum Ausdruck kam. Hier trat ein Verhältnis von 1 : 19 : 47 ein, steigend mit der Leichtigkeit des Bodens. Allerdings ist wohl anzunehmen, daß, wenn im Freien ein Tonboden sein Wasser bis auf 8 Proz. verloren hat, der Sandboden unter gleichen Bedingungen keine 6 Proz. Feuchtigkeit mehr besitzen wird. Immerhin zeigt sich, daß der Tonboden den höchsten Wassergehalt zur Erhaltung der biochemischen Tätigkeit gebraucht. Nach unseren Befunden können wir auch für das freie Land, wo Trockenheit und Nässe wechseln, annehmen, daß mit steigender Schwere der Böden die Zersetzungsschnelligkeit organischer Stickstoffsubstanzen abnimmt.

2. Bildung von Ammoniakstickstoff.

Bei der leichten Zersetzbarkeit des Hornmehles war wohl eine größere Ammoniakbildung vorauszusehen. Wenn Popp bei seinen Arbeiten im günstigsten Falle nur 14 Proz. des angewandten Stickstoffs als Ammon wiederfand, so liegt die Ursache, wie wir sehen werden, im hohen Wassergehalte (20—25 Proz.) des Bodens.

a) Gesamt-Ammoniakstickstoff.

Sandboden.

Gesamtammonstickstoff.

Wassergehalt: 6 %			12 %		18 %	
Anzahl Wochen	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%
3	0,96973	36,68	0,33728	12,76	0,44088	16,68
6	0,59803	22,62	0,00000	0,00	0,00000	0,00
12	0,45568	17,62	0,00000	0,00	0,00000	0,00

Im Sandboden erreichte die Ammoniakbildung in allen Fällen ihren Höhepunkt innerhalb der ersten 3 Wochen, um dann in der trockenen Erde allmählich, bei höherem Wassergehalt schnell abzunehmen.

Lehmboden.
Gesamtammonstickstoff.

Wassergehalt:	8 %		16 %		24 %	
Anzahl Wochen	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%
3	0,50000	18,91	0,95361	36,07	0,42557	16,09
6	1,09135	41,28	0,01845	0,69	0,00000	0,00
12	0,97150	36,73	0,00000	0,00	0,00000	0,00

Hier geht die Umsetzung langsamer als im Sandboden vor sich, denn während bei letzterem in der trockenen Erde der Höchstgehalt an Ammonstickstoff schon nach 3 Wochen eintritt, geschieht dies bei ersterem erst nach ca. 6 Wochen. Auch findet sich bei mittlerem Wassergehalt ein höherer Prozentsatz Ammonstickstoff vor, nämlich 36 Proz. gegen 13 Proz.

Tonboden.
Gesamtammonstickstoff.

Wassergehalt:	8 %		18 %		28 %	
Anzahl Wochen	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%
3	0,00000	0,00	0,27654	10,46	0,00000	0,00
6	0,11337	4,26	0,00000	0,00	0,00000	0,00
12	0,35368	13,37	0,00000	0,00	0,00000	0,00

Bei niedriger Feuchtigkeit stieg der Ammonstickstoffgehalt im Laufe der Wochen allmählich an. Viel tätiger ist der Boden bei höheren Wassermengen, wo trotz der hohen Zersetzlichkeit des Hornmehles nur bei 18 Proz. Wasser in den ersten 3 Wochen Ammonstickstoff nachzuweisen war.

Wir finden also, daß, je höher der Wassergehalt des Bodens ist, der aus Hornmehl gebildete Ammonstickstoff desto schneller verschwindet. Er erreicht die größte Höhe mit 36,68 Proz. im Sandboden und 41,28 Proz. im Lehmboden. Bei der Trägheit des Tonbodens ist für den niedrigsten Wassergehalt die Versuchsdauer von 12 Wochen zu kurz, um den erreichbaren Höhepunkt der Ammoniakbildung festzustellen. Ein scharfer Unterschied in den Böden tritt nur bei dem niedrigsten Wassergehalte hervor. Und zwar wächst die Schnelligkeit der Ammoniakbildung mit der Leichtigkeit der Böden, so daß im Sandboden der Höchstgehalt an Ammonsticksotff schon nach 3, bei Lehmboden nach 6 und bei Tonboden erst nach 12 Wochen gefunden wurde.

b) Wasserlöslicher Ammoniakstickstoff.

Für diesen wurden folgende Zahlen ermittelt:

Sandboden.

	Wassergehalt: 6 %		12 %		18 %	
Anzahl Wochen	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%
3	0,53786	20,34	0,14131	5,35	0,21376	8,09
6	0,36846	13,94	0,00000	0,00	0,00000	0,00
12	0,16266	6,15	0,00000	0,00	0,00000	0,00

Entsprechend den Resultaten der Gesamtammoniakbestimmungen ist der höchste Prozentsatz des wasserlöslichen Ammoniakstickstoffs in trockenem Sandboden bereits nach 3 Wochen nachzuweisen. Es ist wahrscheinlich, daß in den feuchteren Böden der Höhepunkt schon vor dieser Zeit erreicht wurde und daß zur Zeit der Untersuchung das gebildete Ammon zum Teil schon weiter umgesetzt war.

Lehmboden.
Wasserlöslicher Ammonstickstoff.

	Wassergehalt: 8 %		16 %		24 %	
Anzahl Wochen	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%	Aus Hornmehl gebild. Ammon. N. g pro Topf	%
3	0,01059	0.40	0,09179	3,43	0,00000	0,00
6	0,13973	5.29	0.00000	0,00	0,00000	0,00
12	0,11827	4,47	0,00000	0,00	0,00000	0,00

Der 24 Proz. Feuchtigkeit enthaltende Lehmboden enthielt nie wasserlöslichen Ammonstickstoff. Bei mittlerem Wassergehalt scheint die Ammoniakstickstoffbildung ihren Höhepunkt vor der dritten Woche erreicht zu haben, um dann gänzlich zu verschwinden. Parallel dem Gesamtammonstickstoff geht im trockenen Boden die Bildung langsamer vor sich als im Sandboden, so daß wieder ungefähr nach sechswöchentlichem Stehen der Höhepunkt eintritt, um dann ebenfalls abzunehmen.

Im Tonboden war aus Hornmehl gebildeter wasserlöslicher Ammoniakstickstoff nirgends nachzuweisen.

Während also im Sandboden bis zu 20 Proz. wasserlöslicher Ammoniakstickstoff vorhanden war, enthielt der Lehmboden nur 5,29 Proz.; der Tonboden zeigte sich gänzlich frei. Die Kulturpflanzen werden also im Sandboden schnell leicht aufnehmbaren Ammonstickstoff haben, ob ihnen dies aber für die Länge der Zeit zum Vorteil gereicht, ist eine andere Frage, denn in absorptionsfähigeren Böden wird ihnen dafür der Gesamtammonstickstoff länger zur Verfügung stehen.

Die Verhältnisse zwischen wasserlöslichem und mit Magnesia bestimmten Ammon sollen bei den Ammonsulfatumsetzungen erörtert werden.

B. Nitratbildung.

1. Nitrifikation von Ammoniumsulfat.

Das für die Pflanzen wichtigste Umwandlungsprodukt der Ammonsalze als Nährstoff ist die Salpetersäure. Wenn auch die Ammonsalze direkt aufgenommen werden können, so kommen sie doch wegen der meist schnellen Umsetzung im Boden als solche weniger in Betracht als die salpetersauren Salze. Da der Umwandlungsprozeß auf biologischer Grundlage beruht, fragt es sich auch, wie viel bei diesem Prozeß den Kulturpflanzen verloren geht und was mit dem verschwundenen Stickstoff geschehen ist.

Betrachten wir zuerst die Verhältnisse des in der Erde verbliebenen Ammonstickstoffs.

Sandboden.

Anzahl Wochen	Wassergehalt	Vorhandener wasserlöslicher Ammonstickstoff		Vorhandener Gesamt-Ammonstickstoff	
	%	g pro Topf	%	g pro Topf	%
0	6	2,80000	100,00	2,80000	100,00
3		1,69085	60,39	2,51790	89,92
6		1,32090	41,17	1,91100	68,25
12		0,84875	30,31	1,41330	50,47
3	12	1,52005	54,28	2,37020	84,65
6		0,53865	19,23	0,79835	28,51
12		0,00000	0,00	0,12075	4,31
3	18	1,30760	46,70	1,97085	70,37
6		0,41020	14,65	0,61040	21,80
12		0,00000	0,00	0,08715	3,11

Danach verschwand im Sandboden mit niedrigem Wassergehalt der wasserlösliche Ammoniakstickstoff im Laufe des Versuches nur bis zu 70 Proz., während bei höheren Feuchtigkeitsgraden nach 12 Wochen keiner mehr nachzuweisen war. Mit höherem Wassergehalt ging auch die Umsetzung desto schneller vor sich.

Genau ähnliche Verhältnisse zeigte der Gesamtammonstickstoff. Während der trockene Boden die Ammonsalze nur langsam umsetzte, ging der Prozeß in den feuchteren Erden bedeutend schneller. Der Einfluß des Wassergehaltes tritt also stark hervor, denn von den zugegebenen 2,8 g Ammonstickstoff verschwanden während der Versuchsdauer folgende Mengen:

Wassergehalt	6 %	12 %	18 %
3 Wochen	10,08	15,35	29,63 %
6 „	31,75	71,49	78,20 %
12 „	49,53	95,69	96,89 %

Vergleichen wir nun die gefundenen Mengen wasserlöslichen und Gesamtstickstoffs, so finden wir stets eine mehr oder minder große Differenz, die im Laufe der Zeit kleiner wird.

Wassergehalt	6 %	12 %	18 %
3 Wochen	29,53	30,37	29,67 %
6 „	27,08	9,28	7,15 %
12 „	20,16	4,31	3,11 %

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Dieser schwach absorbierte Ammonstickstoff verfällt bei günstigem Wassergehalt schnell der Umwandlung.

Lehmboden.

Anzahl Wochen	Wassergehalt	Vorhandener wasserlöslicher Ammonstickstoff		Vorhandener Gesamt-Ammonstickstoff	
	%	g pro Topf	%	g pro Topf	%
0	8	2,80000	100,00	2,80000	100,00
3		0,61175	21,84	2,40195	85,78
6		0,57347	20,48	2,23200	79,71
12		0,39996	14,28	1,76729	63,12
3	16	0,48404	17,28	2,13899	76,32
6		0,00000	0,00	0,18674	6,67
12		0,00000	0,00	0,03721	1,33
3	24	0,28692	10,24	1,40846	50,32
6		0,00000	0,00	0,05188	1,85
12		0,00000	0,00	0,00000	0,00

Wie beim Sandboden, übte auch hier der Wassergehalt einen starken Einfluß auf das Verschwinden des Ammonstickstoffs aus, indem mit der Größe der Feuchtigkeit sich auch die Umsetzungsschnelligkeit steigerte. Der Lehmboden vermochte bei dem größten Wassergehalt innerhalb der Versuchsdauer sämtliches Ammonsalz zu zersetzen. Während nun die Umsetzung in der trockenen Erde langsam und gleichmäßig vor sich ging, trat sie desto stärker ein, je höher der Wassergehalt wurde, was folgende Gesamtammonstickstoffverlustzahlen zeigen.

Wassergehalt	8 %	16 %	24 %
3 Wochen	14,22	23,68	50,32 %
6 „	20,29	93,33	98,15 %
12 „	36,88	98,67	100,00 %

Wie beim Sandboden, nimmt auch hier der leicht absorbierbare Ammonstickstoff in der trockenen Erde nur allmählich ab, während er bei höherer Feuchtigkeit schnell verschwindet. Gegenüber dem leichten Boden zeigt der Lehm eine bedeutend größere Absorptionsfähigkeit.

Wassergehalt	8 %	16 %	24 %
3 Wochen	63,94	59,04	40,08 %
6 „	59,23	6,67	1,85 %
12 „	48,84	1,33	0,00 %

Am stärksten äußert sich der Einfluß des Wassergehaltes auf die Umsetzung des Ammonstickstoffs im Tonboden, indem z. B. bereits in den ersten 3 Wochen die Ammonzersetzung mit größerer Feuchtigkeit schnell steigt. Während im trockenen Boden noch nach 12 Wochen 60 Proz. des zugesetzten Ammonstickstoffs vorhanden sind, ist derselbe bei 28 Proz. Feuchtigkeit nach 3 Wochen bereits auf ca. 3 Proz. gesunken, um bis zu Ende des Versuches bei genügender Nässe gänzlich zu verschwinden.

Tonboden.

Anzahl Wochen	Wassergehalt	Vorhandener wasserlöslicher Ammonstickstoff		Vorhandener Gesamt-Ammonstickstoff	
	%	g pro Topf	%	g pro Topf	%
0	8	2,80000	100,00	2,80000	100,00
3		0,38998	13,92	2,13950	76,41
6		0,36226	12,93	2,03204	72,57
12		0,23747	8,48	1,68187	60,06
3	18	0,24352	8,69	1,37970	49,27
6		0,00000	0,00	0,15351	5,48
12		0,00000	0,00	0,00000	0,00
3	28	0,00995	0,36	0,08070	2,88
6		0,00000	0,00	0,02489	0,89
12		0,00000	0,00	0,00000	0,00

Die Ammoniakverlustzahlen zeigen folgendes Bild:

Wassergehalt	8 %	18 %	28 %
3 Wochen	23,59	50,73	94,12 %
6 „	27,43	94,52	99,11 %
12 „	39,94	100,00	100,00 %

Auch der Tonboden absorbiert beträchtliche Mengen Ammonsalze, die sich natürlich bei günstiger Zersetzungsmöglichkeit stark verringern.

Wassergehalt	8 %	18 %	28 %
3 Wochen	62,49	40,58	2,52 %
6 „	59,64	5,48	0,89 %
12 „	51,58	0,00	0,00 %

Vergleichen wir nun die drei Böden, so bemerken wir, daß innerhalb der ersten 3 Wochen der Feuchtigkeitsgrad einen großen Einfluß auf die Umsetzung der Ammonsalze ausübt und zwar steigend mit dem Wassergehalt und der Schwere der Böden. In den einzelnen Erden betrug der bestimmbare Ammoniakstickstoffverlust: Sandboden 10 : 15 : 30, Lehmboden 14 : 24 : 50, Tonboden 24 : 51 : 94 Proz. Im Laufe der Zeit verwischen sich diese Unterschiede bei gleichbleibenden Feuchtigkeitsgraden immer mehr. Da nun aber im Sommer die Böden zum großen Teil trocken sein werden, müssen auch die Verhältnisse bei niederer Feuchtigkeit beachtet werden. Hier betrug die Zunahme des Verlustes zwischen der dritten und sechsten, der sechsten und zwölften Woche: Sandboden 22 : 18, Lehmboden 6 : 17, Tonboden 3 : 13 Proz. Es tritt also das umgekehrte Verhältnis ein, indem hier der Sandboden größere Zersetzungszahlen zeigt.

Ein bemerkenswerter Unterschied besteht nun in der Absorptionsfähigkeit der einzelnen Böden für Ammoniumsalze. Während der Sandboden bei niederer Feuchtigkeit nur ca. 30 Proz. leicht absorbiertes Ammoniaksalz enthält, besitzen der Lehm- und Tonboden ca. 60 Proz., also die doppelte Menge. Dieses Ergebnis ist nun nicht weiter erstaunlich, da die besseren

Böden größere Mengen zeolithartiger Substanzen enthalten als die Sandböden. Aber einige Gesamtammoniakzahlen müssen doch recht auffallen. Bei den trockenen Erden stellten wir innerhalb der ersten 3 Wochen folgende Ammoniakverluste fest: Sandboden 10,08, Lehmboden 14,22, Tonboden 23,59 Proz. Was ist mit diesen Ammoniaksalzen geschehen? Entbunden ist kein Stickstoff. Die gebildeten Salpetermengen sind nur minimal, nämlich 3,51 Proz. im Sandboden, 0,48 Proz. im Lehmboden und 0,0 Proz. im Tonboden. Daß der fehlende Stickstoff nicht als organischer festgelegt ist, vor allem im Tonboden mit seiner Arbeitsträgheit, ist wohl klar. Wo steckt er aber? Vermutlich ist er noch als fest absorbierter Ammoniakstickstoff vorhanden. Ein Teil des an den Boden gebundenen Ammonstickstoffs läßt sich mit Magnesia usta nicht bestimmen. Eine Destillation mit Magnesia von einer bekannten Menge Ammonsalz bei Gegenwart von Zeolith zeigt, daß nicht sämtlicher zugegebener Ammonstickstoff wiedergefunden wird. Ähnlich ergeht es den von uns benutzten Böden.

25 g Boden wurden mit 10 ccm einer Lösung durchfeuchtet, welche 0,01 g N als Ammonsulfat enthielt. Eine Magnesiadestillation zeitigte folgendes Ergebnis:

	Nach 24-stündigem Stehen		Nach 48-stündigem Stehen	
	Wiedergefundener Ammonstickstoff	Verlust %	Wiedergefundener Ammonstickstoff	Verlust %
Ammonsulfatlösung .	0,0100	0	0,0100	0
Sandboden	0,0100	0	0,0100	0
Lehmboden . . .	0,0085	15	0,0081	19
Tonboden	0,0075	25	0,0073	27

Zeigt schon der Lehmboden eine kräftige Absorption der Ammonsalze, so ist sie im Tonboden noch stärker.

Der Verlust innerhalb der ersten 3 Wochen nach Stickstoffzugabe ist in unserer Arbeit also kein Umsetzungs-, sondern zum größten Teil ein Absorptionsverlust, der sich vor allem bei der Salpeterbildung in trockenen Böden bemerkbar machen muß.

Wir kommen nun zur Salpeterbildung.

Gebildeter Salpeterstickstoff.

Anzahl Wochen	Wassergehalt	Sandboden		Lehmboden		Tonboden	
		g N pro Topf	%	g N pro Topf	%	g N pro Topf	%
0		0,00000	0.00	0,00000	0.00	0,00000	0.00
3	niedriger	0,09835	3.51	0,01359	0,48	0,00000	0.00
6		0,69755	24.91	0,15061	5,38	0,05617	2,01
12		1,13540	40,55	0,61709	22,03	0,27409	9,78
3	mittlerer	0,26775	9.56	0,31518	11,25	0,72024	25.72
6		1,68212	60,07	2,20445	78,73	2,18881	78,17
12		1,57990	56,42	2,06207	73,64	1,93285	69.03
3	hoher	0,50330	17.97	0,85681	30,60	2,01782	72.06
6		1,44865	51,74	2,09589	74,85	1,84224	65.79
12		1,49345	53,34	1,71614	61,29	1,59845	56,76

Im Sandboden verläuft die Bildung des Salpeterstickstoffs in den ersten 3 Wochen nur langsam, um dann aber die größte Intensität zu erreichen. Wie vorauszusehen war, geht bei niedrigem Wassergehalt die Umsetzung sehr träge vor sich, so daß wir am Schlusse des Versuchs die größte Salpeterbildung mit 40,55 Proz. fanden. Es ist nach den bei höheren Feuchtigkeitsgraden gefundenen Zahlen anzunehmen, daß der Höhepunkt damit noch nicht erreicht wurde. In den ersten 3 Wochen machte sich der Unterschied in den Feuchtigkeitsgraden bedeutend bemerkbar, so daß mit größerer Feuchtigkeit schnellere Salpeterbildung eintrat (3,51, 9,56, 17,97 Proz.). Später verwischen die Differenzen allmählich. Zwischen 12 und 18 Proz. Wasser ist der Bildungsunterschied nur gering. Die größte Salpetermenge wurde mit 60 Proz. nachgewiesen.

Bei einer Vergleichung des gebildeten Nitratstickstoffs und des Gesamtammonstickstoffs finden wir, daß mehr Ammoniakstickstoff verschwand als Nitratstickstoff gebildet wurde. Die Differenzen sind folgende:

Wassergehalt	6 %	12 %	18 %
3 Wochen	6,57	5,79	11,66 %
6 „	6,84	11,42	26,46 %
12 „	8,98	39,27	43,55 %

Aus den obigen Zahlen sehen wir, daß der Ammoniakstickstoff nicht ganz und gar in Nitrat umgesetzt wurde, sondern daß ein großer Unterschied besteht. Absorbiert kann der Stickstoff hier, vor allem im feuchten Sande in so hohem Prozentsatz, nicht sein. Ähnliche Resultate fanden Wagner und Schlösing jun., bei deren Versuchen 94 Proz. des Ammonstickstoffs oxydiert wurden, während sie die restlichen 6 Proz. für entbunden vermuteten. Schneidewind, später auch Lemmermann und Pfeiffer, zeigte aber, daß ein großer Teil des scheinbar verloren gegangenen Stickstoffs durch Bodenorganismen als organische Substanz festgelegt wurde. Ferner fand Tuxen, daß bei seinen Arbeiten in 5 Monaten 28 Proz. des beigegebenen Ammoniumsulfates im Boden so umgesetzt worden waren, daß es weder als Ammoniak, noch als Salpeter nachzuweisen war. Ehrenberg berechnete, daß bis 28 Proz. des gegebenen Ammoniakstickstoffs in Eiweiß verwandelt wurden, Lemmermann im Lehmboden sogar 36,75 Proz. Wir können also annehmen, daß auch bei unseren Versuchen ein großer Teil des Stickstoffs als Mikroorganismeneiweiß festgelegt wurde.

Auch im Lehmboden geht die Salpeterbildung in den ersten drei Wochen relativ langsam vor sich. Während bei niedrigem Wassergehalt die Umsetzung im Laufe des Versuches nur träge fortschreitet, so daß nach Ende des Versuches erst 22 Proz. Salpeterstickstoff gebildet waren, erreicht sie bei den höheren Feuchtigkeitsgraden gegen die sechste Woche die größte Intensität und ihren Höhepunkt mit 78,7 Proz. Da bei 24 Proz. Wasser nach 3 Wochen bereits 30,6 Proz. gegen 11,25 Proz. bei 16 Proz. Wasser Salpeterstickstoff gebildet wurden, und nach 12 Wochen 61,29 Proz. gegen 73,64 Proz. Salpeterstickstoff vorhanden waren, so ist wohl anzunehmen, daß bei der größten Feuchtigkeit auch die stärksten biochemischen Umsetzungen vor sich gingen.

Die Differenzen zwischen dem verschwundenen Ammonsalz und dem gebildeten Salpeter steigen im Laufe der Wochen im Lehmboden ebenfalls an. Infolge der Absorptionserscheinung sind sie hier im trockenen Boden schon in der ersten Zeit größer als im Sandboden.

Wassergehalt	8 %	16%	24%
3 Wochen	13,74	12,43	19,72%
6 „	14,91	14,60	23,30%
12 „	14,85	25,30	38,71%

Der trockene Tonboden zeigte nur geringe Nitrifikation. In den ersten 3 Wochen scheint überhaupt kein Salpeterstickstoff gebildet worden zu sein, und dann schreitet die Bildung nur langsam fort. Bei mittlerem Wassergehalt erreicht der Salpeterstickstoff seinen Höhepunkt nach 6 Wochen mit 78 Proz. Dagegen ist nach 12 Wochen die vorhandene Menge wieder geringer, indem entweder der Stickstoff in Eiweißstickstoff verwandelt oder frei gemacht worden war.

In dem Boden mit der höchsten Feuchtigkeit wurde der größte Salpetergehalt bereits nach 3 Wochen gefunden, um dann beständig geringer zu werden. Der für die Pflanzen günstigste Wassergehalt dürfte demnach der mittelste sein, da ihnen hier voraussichtlich am längsten und vorteilhaftesten der Salpeterstickstoff erhalten bleibt.

Auch im Tonboden vergrößert sich die Differenz zwischen verschwundenem Ammonstickstoff und gebildeten Salpeterstickstoff im Laufe des Versuches. Doch beträgt sie hier bereits nach 3 Wochen selbst im trockenen Boden schon ca. 25 Proz., während als größte Salpetermenge bei niederem Wassergehalt überhaupt nur 10 Proz. nachgewiesen wurden.

Wassergehalt	8%	18%	28%
3 Wochen	23,59	25,01	25,06%
6 „	25,42	16,35	33,32%
12 „	30,16	30,97	43,24%

Die hier vorhandenen Differenzen können in dieser Zeit fast nur auf fester Absorption des Ammoniaks beruhen. Für die Landwirtschaft wird also zu beachten sein, daß der Tonboden in trockenen Jahren die Ammondüngesalze sehr fest hält und dieselben erst durch die Feuchtigkeit des nächsten Jahres wieder gelöst werden.

Entsprechend den Ammonsalzverlusten übt der Feuchtigkeitsgrad auch auf die Salpeterbildung in den ersten dreiWochen einen großen Einfluß aus und zwar wiederum stark steigend mit dem Wassergehalt und der Schwere der Böden, so im Sandboden mit 4 : 10 : 18, Lehmboden 0 : 11 : 31, Tonboden 0 : 26 : 72 Proz. der angewandten Ammonmenge. In den trockenen Erden sinkt dagegen die Salpeterbildungsfähigkeit mit der Schwere der Böden. Bei größerer Feuchtigkeit scheint also in den schwereren Erden eine intensivere Salpeterbildung einzutreten, eine längere werden dagegen die Sandböden haben, da sie noch bei relativ großer Trockenheit sehr tätig sind. Die höchste Salpetermenge wurde im Lehm- und Tonboden mit ca. 78 Proz. gefunden, im Sandboden nur mit 60 Proz., alsdann trat wieder ein Rückgang ein.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

2. Nitratstickstoff aus Hornmehl.

Die folgende Tabelle zeigt den aus organisch gebundenem Stickstoff und den aus der geringen Menge Ammonstickstoff des Hornmehls gebildeten Salpeterstickstoff. Die Summe muß hier angeführt werden, da sich nicht feststellen läßt, wie viel des gefundenen Salpeterstickstoffs aus der minimalen Menge des Ammonstickstoffs herrührt.

Gebildeter Salpeterstickstoff.

Anzahl Wochen	Wassergehalt	Sandboden		Lehmboden		Tonboden	
		g N pro Topf	%	g N pro Topf	%	g N pro Topf	%
3	niederer	0,24625	8,99	0,00000	0,00	0,01731	0,63
6		1,03390	37,74	0,07862	2,87	0,00000	0,00
12		1,16760	42,63	0,35694	13,03	0,05393	1,96
3	mittlerer	0,81130	29,61	0,25786	9,41	0,51074	18,64
6		1,34645	49,15	1,60800	58,71	1,56800	57,24
12		1,52110	55,53	1,47564	53,87	1,50296	54,87
3	hoher	0,59815	21,83	0,64064	23,38	1,00950	36,85
6		1,26805	46,74	1,35901	49,61	1,06212	38,77
12		1,50570	54,97	1,06853	39,01	0,66290	24,20

Beim Sandboden wächst bei allen drei Feuchtigkeitsmengen die Bildung des Salpeters bis zum Ende der Untersuchungen. Die Umsetzung war in allen drei Fällen in den ersten sechs Wochen am schnellsten, um dann langsamer zu werden. Zwischen den höheren Feuchtigkeitsgraden trat kein großer Unterschied hervor, dagegen blieb der trockene Boden etwas zurück, vornehmlich innerhalb der ersten drei Wochen.

Entgegengesetzt zum Sandboden ist die Nitrifikation im Lehmboden bei niederem Wassergehalt nur gering. In den ersten drei Wochen war hier überhaupt keine Nitratbildung zu bemerken. Bei mittlerer Feuchtigkeit ist die Umsetzung in den zweiten drei Wochen am größten und wurde daselbst auch die größte Menge Nitratstickstoff gefunden. Ähnliche Zahlen zeigt der höchste Wassergehalt, welcher für die Salpeterbildung jedoch nicht den günstigsten Zustand darzustellen scheint, da die Nitratmengen hinter denen bei mittlerer Feuchtigkeit gefundenen zurückbleiben.

Noch größer werden die Differenzen im Tonboden. Während bei niederem Wassergehalt innerhalb der ganzen Versuchsdauer nur Spuren von Nitratstickstoff gebildet wurden, stellte sich die Salpeterbildung bei mittlerem ebenso günstig wie im Lehmboden, bei der größten Feuchtigkeit jedoch auf die Dauer etwas ungünstiger.

Die Salpeterbildung aus Hornmehl scheint daher am günstigsten im Sandboden zu verlaufen und nur bei mittlerer Feuchtigkeit verhalten sich die besseren Böden ähnlich den leichteren. Hier erreicht die Nitratbildung ihre Höhe im Sandboden mit 56, Lehmboden mit 59 und Tonboden mit 57 Proz. des angewandten Ammonstickstoffs. Der niedrigste und höchste Wassergehalt wirkte bei beiden besseren Böden nachteilig auf die Nitrifikation ein. Der Sandbodon zeigte dagegen nur geringe Unterschiede.

Wie verhielten sich nun die Salpeterbildung aus Ammonsulfat und Hornmehl zueinander?

Wassergehalt	Wochen	Sandboden Nitratstickst. aus Ammoniumsulfat %	Sandboden Nitratstickst. aus Hornmehl %	Lehmboden Nitratstickst. aus Ammoniumsulfat %	Lehmboden Nitratstickst. aus Hornmehl %	Tonboden Nitratstickst. aus Ammoniumsulfat %	Tonboden Nitratstickst. aus Hornmehl %
niederer	3	3,51	8,99	0,48	0,00	0,00	0,63
	6	24,91	37,74	5,38	2,87	2,01	0,00
	12	40,55	42,63	22,03	13,03	9,78	1,96
mittl.	3	9,56	29,61	11,25	9,41	25,72	18,64
	6	60,07	49,15	78,73	58,71	78,17	57,24
	12	56,42	55,53	73,64	53,87	69,03	54,87
hoher	3	17,97	21,83	30,60	23,38	72,06	36,85
	6	51,74	46,74	74,85	49,61	65,79	38,77
	12	53,34	54,97	61,29	39,01	56,76	24,20

Im Sandboden ist die aus Hornmehl gebildete Salpetermenge in den ersten drei Wochen größer als die aus Ammonsulfat erzeugte, später nimmt aber die Umsetzungsintensität das umgekehrte Verhältnis ein, indem die Nitratmenge aus Ammonsulfat plötzlich stark ansteigt, während sie im Hornmehl bis zum Schluß des Versuches sich allmählich vergrößert. Der Höhepunkt des aus Ammonsulfat gebildeten Salpeters wird durch das Hornmehl nicht erreicht (60 : 56). Für alle Verhältnisse ungünstiger stellt sich die Nitratbildung aus Hornmehl bei den beiden besseren Böden. Hier ist die Salpeterbildung im Laufe der einzelnen Wochen stets geringer als aus Ammonsulfat.

Betrachtèn wir nun noch die Nährstoffmengen, welche den Pflanzen bei unseren Versuchen als leicht aufnehmbar zur Verfügung gestanden hätten, so zeigt sich klar, daß die Ammonsulfatdüngung im allgemeinen eine günstigere Wirkung erzielen muß.

Vorhandener Salpeter- und Ammonstickstoff in % der zugesetzten Stickstoffmenge.

Nach Wochen der Düngerzugabe	Wassergehalt	Sandboden aus Hornmehl	Sandboden aus Ammonsnlfat	Lehmboden aus Hornmehl	Lehmboden aus Ammonsulfat	Tonboden aus Hornmehl	Tonboden aus Ammonsulfat
3	niederer	45,7	93,4	18,9	86,3	0,6	76,4
6		60,3	93.2	44,2	85,1	4.3	74,6
12		60,2	91,1	49,7	85,1	15,4	69.9
3	mittlerer	42,4	94,3	45,5	87.6	29,1	75,0
6		49,2	88,6	58,7	85,4	57,2	83,7
12		55,5	60,7	53,9	74,9	54,9	69,0
3	hoher	38,5	88,4	39,5	80.9	36,9	75,0
6		46,7	73,5	49,6	76.8	38,8	66,7
12		55,0	53,4	39,0	61,3	24,2	56.8

C. Entbindung von elementarem Stickstoff.

Viele Forscher führten die Minderwirkung des schwefelsauren Ammoniums hauptsächlich auf Ammoniakverdunstung zurück. Indessen haben zahlreiche Experimente zweifellos bewiesen, daß nur in äußerst seltenen Fällen und durchaus nicht unter normalen Bedingungen Ammoniak als solches aus dem Boden entweicht und dann nur in ganz geringen Mengen. Wenn ein Übergang von Bodenstickstoff in die Atmosphäre stattgefunden hat, so ist dies meist auf Entbindung elementaren Stickstoffs zurückzuführen. Zwei Möglichkeiten kommen dabei in Betracht: Die Stickstoffentbindung durch Denitrifikation und die eventuelle Stickstoffentbindung beim Zerfall organischer Substanzen. Versuche hatten gezeigt, daß, abgesehen von der tatsächlichen Anwesenheit von Nitrat, zwei Bedingungen zur Denitrifikation nötig waren, nämlich Luftabschluß und Anwesenheit geeigneter Substanzen. Ersterer wird durch übermäßige Feuchtigkeit leicht erreicht, letztere bilden organische Substanzen. Daher ist bei unserer Arbeit der Stickstoffverlust bei Hornmehlzugabe und höchstem Wassergehalt größer als bei Ammonsulfat.

Den ersten bemerkenswerten Stickstoffverlust finden wir im Sandboden nur bei höchstem Wassergehalt und Hornmehldüngung mit 0,25450 g N = 9,08 Proz. N nach 12 Wochen Versuchsdauer.

Im Lehmboden spielt der Wassergehalt eine größere Rolle. Bei 16 Proz. Feuchtigkeit scheint die organische Substanz des Hornmehls kaum eine Bedeutung zu haben. Indessen ist bei höchstem Wassergehalt der Verlust bei Hornmehldüngung fast doppelt so groß als der bei Ammonsulfat.

Die Wirkung der organischen Substanz des Hornmehls tritt im Tonboden stark hervor, wo bei größerer Feuchtigkeit am Ende des Versuches ein Stickstoffverlust eintrat.

Nach Wochen	Wassergehalt	Düngung	Boden	Stickstoffverlust g pro Topf	%
12	18	Hornmehl	Sandboden	0,25450	9,08
12	16	Ammonsulfat	Lehmboden	0,21919	7,83
12	24	„	„	0,55547	19,84
12	16	Hornmehl	„	0,19844	7,09
12	24	„	„	0,90142	32,19
12	18	„	Tonboden	0,16414	5,86
12	24	„	„	0,91457	32,66

Eine wirklich empfindliche Entbindung von Stickstoff trat nur im Lehmboden bei dem höchsten Wassergehalt und beiden Düngungen ein, im Tonboden nur unter Zugabe von organischem Stickstoff und größter Feuchtigkeit. In allen drei Böden wird aus organischem Stickstoff mehr entbunden als aus mineralischem.

Eine Stickstoffbindung war nicht zu bemerken.

II. Stickstoffumsetzungen bei Gegenwart organischer Substanz.

Bei diesen Versuchen wurden die bereits zum ersten Teil benutzten Böden verwendet.

Für jede Erde waren 12 Töpfe vorgesehen, und diese wurden auf folgende Weise gedüngt:

2 ohne Düngung ohne organische Substanz,
2 „ „ mit organischer „
2 mit Ammoniumsulfat ohne organische Substanz,
2 „ „ mit organischer „
2 „ Salpeter ohne organische Substanz,
2 „ „ mit organischer „

Als organische Substanz wurde Rohrzucker verwendet, und zwar 25 g pro Topf mit 7000 g trockener Erde.

Die Düngung von Ammonsulfat bestand in 13,333 g = 2,8 g Ammonstickstoff (21 Proz. N). Salpeter wurden 17,316 g bei 16,17 Proz. N = 2,8 g Nitratstickstoff pro Topf gegeben.

Die Feuchtigkeitsgrade betrugen für Sandboden 12 Proz., Lehmboden 16 Proz., Tonboden 18 Proz. Wasser. Die Töpfe wurden zweimal wöchentlich gewogen und die geringen Wasserverluste ausgeglichen.

Die Untersuchungen wurden zu Anfang der Versuche und nach 6 Wochen vorgenommen.

A. Nitratbildung.

Da die Nitrifikationsorganismen ziemlich empfindlich gegen große Mengen löslicher organischer Substanz sind, verhindern diese leicht die Oxydation der Ammonsalze. Im Boden selbst sind nun allerdings in seltenen Ausnahmefällen so große Mengen solcher Substanzen vorhanden, daß eine wirkliche Hemmung der Salpeterbildung darauf zurückgeführt werden könnte.

Abnahme des Ammonstickstoffs.

Boden	Wassergehalt	Düngung	Wasserl. Ammon-Stickstoff		Ges. Ammon-Stickstoff	
			g pro Topf	%	g pro Topf	%
Sandboden	12%	Ammoniumsulfat ohne org. Substanz	2,38315	85,11	2,11960	75,70
	12%	Ammoniumsulfat mit org. Substanz	2,36530	84,47	2,15740	77,05
Lehmbod.	16%	Ammoniumsulfat ohne org. Substanz	2,71565	96,98	2,25190	80,42
	16%	Ammoniumsulfat mit org. Substanz	2,75520	98,40	2,69290	96,17
Tonboden	18%	Ammoniumsulfat ohne org. Substanz	2,80000	100,00	2,80000	100,00
	18%	Ammoniumsulfat mit org. Substanz	2,80000	100,00	2,80000	100,00

Einen Einfluß auf die Ammonsulfatzersetzung zeigt die organische Substanz nur beim Gesamtammonstickstoff und dem Lehmboden.

Deutlich ist dagegen die Wirkung auf die Salpeterbildung.

Gebildeter Salpeterstickstoff.

Düngung	Sandboden 12% H_2O		Lehmboden 16% H_2O		Tonboden 18% H_2O	
	g N pro Topf	%	g N pro Topf	%	g N pro Topf	%
Ammonsulfat ohne organische Substanz	1,61070	57,52	1,62680	58,10	1,98590	70,92
Ammonsulfat mit organischer Substanz	1,42450	50,87	1,48330	52,97	1,72550	61,62

In allen drei Böden wurde die Nitrifikation durch Zusatz von Zucker fast gleichmäßig stark gehemmt. Die größte Umsetzung zeigte in beiden Fällen der Tonboden. Die Differenzen zwischen dem gefundenen Salpeterstickstoff in den Böden ohne und mit organischer Substanz können nur durch eine stärkere Ammon- und Salpeterassimilation oder die schädliche Wirkung einer zu reichlichen Menge löslicher organischer Substanzen auf die Nitrifikationsmikroben hervorgerufen werden.

Die Differenz zwischen der Abnahme des Ammonstickstoffs und des gebildeten Salpeterstickstoffs beträgt im Sandboden ohne Zusatz von organischer Substanz nur 18 Proz. des zugesetzten Ammonsulfats, mit organischer Substanz hingegen 26 Proz. Am stärksten ist die Wirkung des Zusatzes von Zucker im Lehmboden mit 22,32 gegen 43, 20 Proz. mit Beigabe. Im Tonboden sind die Beziehungen ungefähr dieselben wie die im Sandboden, nämlich 29,08 : 38,38 Proz. Der Zusatz von organischer Substanz veranlaßt lebhafteres Bakterienwachstum, wozu auch eine größere Menge Stickstoff nötig ist. Es ist daher leicht erklärlich, daß der mineralische Stickstoff bei Gegenwart von gärungsfähigen Substanzen geringer ist als ohne solche.

Eine Stickstoffentbindung trat hier nicht ein.

B. Eiweißbildung (Salpeterassimilation).

Daß der Salpeter unter gewissen Bedingungen für viele Mikroorganismen als brauchbare Stickstoffquelle dient, hat schon lange Zeit hindurch als feststehende Tatsache gegolten. Man hat zahlreiche Bakterien und Pilze untersucht und diese Eigenschaft bei ihnen gefunden. Auch ist festgestellt worden, daß viele ammonassimilierende Bakterien ebenfalls zur Aufnahme des Nitratstickstoffs befähigt sind. Die Intensität der Salpeterassimilation hängt von der Menge der vorhandenen organischen Substanz, der Art der Substanz, der Temperatur und der Durchlüftung ab. Als beste Kohlenstoffquellen sind Substanzen nachgewiesen worden, wie z. B. Glyzerin, Laktat, Traubenzucker, Rohrzucker usw. Ausgiebige Lüftung ist für eine rasche Salpeterassimilation vorteilhaft.

Eine Anzahl Arbeiten verschiedener Forscher zeigen, daß die Salpeterassimilation in der Erde unter Umständen eine nicht unbedeutende Rolle spielen kann. Schneidewind und Krüger führten nach dieser Richtung hin zahlreiche Vegetationsversuche aus. Sie verglichen die Ernteergebnisse bei einer Düngung von Salpeter mit derselben unter Zusatz von Kot-Stroh oder anderen organischen Substanzen. Mit diesen Beigaben fanden sie, daß ein Ernteausfall und eine verminderte Stickstoffaufnahme seitens der Pflanzen stattgefunden hatte. Die Hinzufügung von organischen Substanzen veranlaßt eine große Zunahme der Bakterien, die ihren Stickstoffbedarf auf Kosten des Salpeters beziehen, also in Eiweißstickstoff verwandeln, wodurch er den Pflanzen entzogen wird.

Die Untersuchungen ergaben ferner, daß die Bodenfeuchtigkeit einen großen Einfluß auf die Salpeterassimilation, also auch auf den Ernteausfall hat. Die Temperatur spielt bei der Salpeterassimilation und der Zersetzung ebenfalls eine große Rolle.

Die Analysen der Böden ohne Salpeterzugabe bei Gegenwart von Kohlehydrat zeigten, daß der anfangs in den Erden vorhandene Nitratstickstoff nach 6 Wochen fast gänzlich verschwunden war, wohingegen er in den Töpfen ohne organische Substanz weiter fortschritt.

Betrachten wir nun die Erden mit Salpeterzusatz:

Abnahme des Salpeterstickstoffs.

	Sandboden		Lehmboden		Tonboden	
	g N pro Topt	%	g N pro Topf	%	g N pro Topf	%
Salpeter ohne organische Substanz	0,66745	23,83	0,40180	14,35	0,45290	16,17
Salpeter mit organischer Substanz	0,86590	30,93	0,69160	24,70	0,70550	25,19

In den Böden ohne Zugabe von organischer Substanz liefert der Sandboden die größte Abnahme des Salpeterstickstoffs. Da keine Stickstoffentbindung stattgefunden hat, muß derselbe festgelegt sein. Wir können hieraus als höchstwahrscheinlich schließen, daß bei einer Felddüngung mit so hoher Salpetergabe ebenfalls eine merkliche Menge des zugegebenen Stickstoffs assimiliert wird, dadurch den Pflanzen einige Zeit als Ernährungssubstanz verloren geht.

Bei Gegenwart von Zucker war der Salpeterverlust für jeden Boden erhöht, die größte Stärke erreichte er wieder im Sandboden. In diesem und im Lehmboden wurde jedoch im Gegensatz zu den Ammonsulfattöpfen ein Stickstoffverlust durch Entbindung festgestellt, so daß die stärkste Assimilation im Tonboden stattfand. Jedenfalls wurde der Stickstoff dadurch in beiden Fällen den Kulturpflanzen vorerst entzogen.

Eine Entbindung von elementarem Stickstoff fand nur bei den Salpetertöpfen mit organischer Substanz statt und zwar 11,43 Proz. im Sandboden und 14,67 im Lehmboden.

Ziehen wir diese Mengen von den Salpeterverlusten ab, so erhalten wir für den festgelegten Stickstoff folgende Zahlen:

23,83% im Sandboden ohne, 19,50% mit organischer Substanz
14,35% „ Lehmboden , 10,03% „ „ „
16,17% „ Tonboden „ , 25,19% „ „ „

Da bei dem Tonboden kein Stickstoff verloren gegangen ist, wurde bei Gegenwart von Zucker mehr assimiliert als ohne Kohlehydrat. Infolge der Stickstoffverluste durch Entbindung trat nur beim Sand- und Lehmboden das Entgegengesetzte ein, d. h. die Assimilation von Stickstoff wurde bei Gegenwart von Zucker herabgesetzt. Beim Lehmboden trat diese Erscheinung so stark auf, daß mehr Stickstoff verloren ging als festgelegt wurde. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei einem höheren Wassergehalt des Tonbodens ebenfalls Stickstoffentbindung eingetreten wäre, da eine Wassermenge von 18 Proz. im Tonboden wahrscheinlich eine geringere Wirkung ausübt als 16 Proz. im Lehmboden.

Nun ist aber zu bemerken, daß bei den Ammoniumsulfatumsetzungen nirgends eine Stickstoffentbindung eingetreten ist, auch nicht im Sand- und Lehmboden. Die zugesetzten Salpetermengen (ca. 30 Ztr. pro Morgen) und Zucker (ca. 40 Ztr. pro Morgen) sind so erheblich, daß sie in der landwirtschaftlichen Praxis keine Anwendung finden. Demnach ist wohl ein Verlust von Stickstoff bei den in der Landwirtschaft gebräuchlichen Düngungsmengen kaum zu erwarten.

Ergebnisse.

1. Die Zersetzung des organischen Stickstoffs trat bei niederen Feuchtigkeitsgraden im Sandboden lebhafter ein als in den besseren Böden, während sich bei höherem Wassergehalt der Unterschied ziemlich ausglich.

Die Umsetzung des Ammonsulfates und die Bildung des Salpeters ging in allen drei Böden um so schneller vor sich, je höher der Wassergehalt war. Die Erden selbst unterschieden sich insofern, als bei den besseren Böden eine bedeutend lebhaftere biochemische Tätigkeit eintrat, obschon bei dem niedrigsten Feuchtigkeitsgrade die Umsetzungen im Sandboden stärker einsetzten. Es zeigte sich während der ganzen Arbeit, daß die 6 Proz. Feuchtigkeit des Sandbodens eine viel günstigere Bakterientätigkeit hervorriefen, als die 8 Proz. Feuchtigkeit des Tonbodens. Beide Feuchtigkeitsmengen entsprechen sich also nicht.

Der aus Hornmehl gebildete Ammoniakstickstoff verschwand bei größerer Feuchtigkeit in allen Böden schnell, dagegen erhielt er sich in den trockenen Erden ziemlich lang und erreichte seinen Höhepunkt desto eher, je leichter der Boden war, im Sandboden nach drei Wochen mit 36—68 Proz., im Lehmboden nach sechs Wochen mit 41,28 Proz. und im Tonboden am Schluß des Versuches mit nur 13,37 Proz.

Die leichte sowie feste Absorption der Ammonsalze ist um so größer, je schwerer die Böden sind. Sie muß sich vor allem in trockenen Jahren bemerkbar machen.

Der Sandboden vermochte bis zum Schluß des Versuches 97 Proz., der Lehm- und Tonboden sogar 100 Proz. des zugefügten Ammonsulfates umzusetzen, dessen Stickstoff aber nicht vollständig als Salpeter wiedergefunden wurde.

Am günstigsten verlief die Salpeterbildung aus Hornmehl im Sandboden, nur bei mittlerem Wassergehalt zeigten die besseren Böden ähnliche Verhältnisse. Größere Salpetermengen lieferte bei allen Erden jedoch die Ammonsulfatdüngung, mit Ausnahme des trockenen Sandbodens und der ersten Wochen bei größerer Feuchtigkeit.

Im allgemeinen lag die stärkste Salpeterbildung bei allen Böden zwischen der dritten und sechsten Woche nach Zugabe der Düngung, nur der Tonboden mit höchstem Feuchtigkeitsgrade zeigte die größte Umsetzungsintensität bereits in den ersten drei Wochen. Zur Zeit des größten nachgewiesenen Salpetergehaltes, nach sechswöchentlicher Versuchsdauer bei mittlerer Feuchtigkeit waren folgende Verhältnisse leicht aufnehmbaren Stickstoffs vorhanden:

Düngung	Sandboden		Lehmboden		Tonboden	
	Salp. N	Ammon N	Salp. N	Ammon N	Salp. N	Ammon N
Ammonsulfat	60,07	28,51	78,83	6,67	78,17	5,48
Hornmehl	49,15	0,00	58,71	0,69	57,24	0,00

Den Pflanzen stehen also bei der mineralischen Stickstoffdüngung größere Nährstoffmengen zur Verfügung als bei einer organischen.

Eine bemerkenswerte Stickstoffentbindung trat nur bei höchstem Wassergehalt ein, bei Ammonsulfat im Lehmboden mit 19,8 Proz. des zugesetzten Ammonstickstoffs am Schlusse des Versuches, bei Hornmehl mit seiner reichen Kohlenstoffquelle dagegen 32,2 Proz. beim Lehmboden und 32,7 Proz. beim Tonboden.

2. Eine besonders starke Zugabe von organischer Substanz, wie sie in Form von Zucker stattfand, verringerte die löslichen Stickstoffverbindungen dermaßen, daß für

die Kulturpflanzen ein Stickstoffmangel eintreten kann. So verschwand der zugesetzte Ammonsulfatstickstoff in allen drei Böden bei Gegenwart von Zucker schneller als ohne Zugabe, aber der gebildete Salpeter nahm dementsprechend nicht zu. Der verschwundene Stickstoff war von den Bakterien aufgenommen worden.

Durch die Zugabe von organischer Substanz (Zucker) zur Ammonsulfatdüngung fiel der Salpetergehalt beim Sandboden von 57,52 auf 50,87, beim Lehmboden von 58,10 auf 52,97, beim Tonboden von 70,92 auf 61,62 Proz. Dementsprechend stieg der festgelegte und verschwundene Stickstoff durch die Zugabe von Zucker beim Sandboden von 18,18 auf 26,18, beim Lehmboden von 22,32 auf 43,20, beim Tonboden von 29,08 auf 38,38 Proz. Auch die Salpeterassimilation wurde durch eine Zuckergabe erhöht. Von den zugesetzten Stickstoffmengen waren, wo organische Substanz zugegeben war, beim Sandboden 11,43, beim Lehmboden 14,67 Proz. in Form von elementarem Stickstoff verloren gegangen, während ein solcher Verlust beim Tonboden nicht festgestellt wurde.

Eine Stickstoffbindung konnte nicht nachgewiesen werden.

Nachdruck verboten.

Über die Schwefelwasserstoffgärung im schwarzen Heilschlamme.[1]

[Physiologisches Kabinett der Universität Odessa. Laboratorium der Ärzte-Gesellschaft in Essentucki.]

Von **W. Sawjalow**, Odessa.

Mit 5 Textfiguren.

Der Schwefelwasserstoff kann in den Gewässern auf dreierlei Weise entstehen: 1. Bei der Fäulnis der Eiweißstoffe; 2. durch Reduktion der oxydierten Schwefelverbindungen mittels naszierenden Wasserstoffes und 3. durch biologische Reduktion der Sulfate. Die beiden ersten Möglichkeiten scheinen in der Natur keine bedeutende Rolle zu spielen, und zwar aus folgenden Gründen: Wasserstoff in statu nascendi reduziert wohl alle Schwefeloxyde, aber mit Ausschluß von Schwefelsäure und deren Salzen. Und gerade die Sulfate sind die gewöhnlichste und die am meisten verbreitete Form der natürlichen Schwefelverbindungen. Aber die Schwefelsäure kann durch naszierenden Wasserstoff unter Bedingungen reduziert werden, welche sich in der Natur sicher nicht vorfinden. Es muß nämlich die Konzentration der Schwefelsäure mehrere Prozente betragen, damit eine solche Reduktion von statten gehen kann. Die Eiweißfäulnis als Quelle des Schwefelwasserstoffes ist wohl im Auge zu behalten, aber der Umfang der Eiweißfäulnis in den Gewässern ist sehr bescheiden, weil der Eiweißvorrat der im Wasser faulenden Sub-

---

[1] Die hauptsächlichsten Resultate dieser Arbeit wurden in der Sitzung der Ärzte-Gesellschaft in Essentucki im Jahre 1912 vorgetragen.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

stanzen (hauptsächlich pflanzlichen) bekanntlich ziemlich klein ist. Deswegen zeigen meistens die Bodenniederschläge der süßen Gewässer eine weiße oder höchstens eine graue Farbe; demgegenüber sind die Bodenablagerungen in den Salzwasserbehältern infolge des Schwefeleisengehaltes ziemlich konstant schwarz gefärbt (z. B. Schwarzes Meer, Limane, Salzseen). Indessen übertrifft die Flora der süßen Gewässer die des Salzwassers ums vielfache, weswegen der Eiweißvorrat daselbst viel größer ist als im Salzwasser. Daher ist die hauptsächliche Ursache der Schwefelwasserstoffbildung in dem schwarzen Schlamme in der biologischen Sulfatreduktion zu suchen. Diese Annahme wird durch folgende Versuche gestützt: Bekanntlich verliert der schwarze Schlamm beim Trocknen seine Farbe, da das Eisensulfid dabei zu Ferrosulfat oxydiert wird. Wenn man aber die getrocknete und gepulverte Masse mit Wasser oder mit einer Nährpeptonlösung übergießt, so schwärzt sich der Bodensatz ziemlich rasch infolge der biologischen Schwefelwasserstoffbildung; die vorherige Sterilisation des Gemisches hebt die Schwärzung gänzlich auf (A. Werigo). Dieser Versuch läßt sich in verschiedener Weise erklären. Es kann die hier stattfindende Schwefelwasserstoffbildung sowohl infolge der Eiweißfäulnis als auch infolge der Sulfatreduktion vor sich gehen. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu entscheiden, befreite ich die mir zu Gebote stehenden schwarzen Schlammarten (aus dem Kujalnik-Liman bei Odessa und aus dem Tambukansee bei Piatigortk) von den in ihnen enthaltenen Sulfaten. Durch bloßes Auswaschen gelingt das nicht, wahrscheinlich weil in den Schlammen einige ganz unlösliche schwefelsaure Salze vorhanden sind. Darum wurde die getrocknete Masse mit Wasser übergossen und bei 25° sich selbst überlassen, bis die Schwärzung eintrat. Dann wurde der schwarze Bodensatz abfiltriert, getrocknet, mit Wasser ausgewaschen, wieder mit Wasser übergossen und beiseite gestellt und so weiter. Die Reduktion im Wasser und die darauffolgende Oxydation beim Trocknen wurde einige Male wiederholt, bis schließlich ein graues Pulver erhalten wurde, das sich nicht mehr mit dem Wasser schwärzte. Dieses Pulver mit Nährpeptonlösung übergossen und mit einer Spur Eisensalz vermischt, schwärzte sich bei 25° kaum; dasselbe Pulver, mit der Beijerinckschen Nährlösung[1]) übergossen, wurde sehr rasch intensiv schwarz; mit derselben Lösung, die aber ohne Sulfate hergestellt war, konnte man auch keine Schwärzung des Niederschlages erzielen. Dieser Versuch zeigt, daß die Hauptrolle bei der biologischen Schwefelwasserstoffbildung der Sulfatreduktion und nicht etwa der Eiweißfäulnis zukommt.

Weitere Versuche zeigten, daß Schwefelwasserstoff ganz ohne Eiweißstoffe entstehen kann. Es schwärzt sich nämlich gewöhnlicher roter Ton, wenn er mit der Nährflüssigkeit von Beijerinck übergossen und mit einer Öse Schwarzschlamm geimpft wird, ziemlich rasch und vollständig. Auf diese Weise erhielt ich die Schwärzung des roten Tones in einem geräumigen Behälter; dabei kommen die Prozesse der Heilschlammbildung in den Salzseen ziemlich anschaulich zum Vorschein. Der rote Ton wurde mit etwas Filtrierpapiermasse vermischt und dann mit dem Salzwasser aus dem Kujalnik-Liman übergossen; zu dem Wasser wurde $^1/_{10}$ Volum der Beijerinckschen Nährflüssigkeit zugegeben. Die oberen Schichten des Tones schwärzten sich ziemlich rasch, aber in den tieferen Schichten erschienen nur vereinzelte, schwarze Inseln. Die oberflächlichste Tonschicht ist mit der

---

[1]) Die Lösung enthält Magnesiumsulfat, Kaliumphosphat, Asparagin, milchsaures Natron und eine Spur Eisensalz. (Centralbl. f. Bakt. Bd. I.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Zeit infolge der Oxydation hell geworden. Darunter entwickelten sich inmitten der schwarzen Schicht massenhafte Kolonien von Purpurbakterien. Die Glaswände bedeckten sich allmählich mit Ferrihydroxydbelag, was auf die Migration des Eisens durch das Wasser hinweist (Abb. 1).

Zur Isolierung des Erregers der Schwefelwasserstoffbildung bediente ich mich der oben angeführten Nährflüssigkeit von Beijerinck. Die sterilisierte Nährflüssigkeit wurde mit einer kleinen Menge schwarzen Schlammes infiziert und bei 25° sich selbst überlassen. Als die Flüssigkeit sich schwärzte, wurde sie auf dieselbe Flüssigkeit, aber mit 10 Proz. Gelatine vermischt, übergeimpft. Die in der Gelatine auftretenden schwarzen Flecken wurden auf neue Portionen derselben Gelatine übergeführt und mehrere Male überimpft, bis eine Kultur erhalten wurde, welche auf gewöhnlichen Nährmedien nicht mehr wuchs, also vollständig rein war. Es gelingt nur selten, die Form der Kolonien zu sehen, weil die Schwärzung des Mediums sehr stark und rasch vor sich geht und auf die ganze Masse der Gelatine sich verbreitet. Die zuerst erscheinenden schwarzen Flecken zeigen unter dem Mikroskop nur spärliche lebende Individuen, und zwar oft im Stadium des Auswachsens aus den Sporen. Die Spore erscheint in diesen Fällen aufgeblasen und färbt sich sehr schwach; aus dem einen Pol der Spore entsproßt ein Faden, welcher zuweilen ziemlich lang wird und mehrere leichte Biegungen aufweist. Der Fadeninhalt ist bei den längeren Fäden fast immer fragmentiert (Abb. 2).

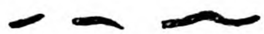


Fig. 1. Verschiedene Stadien des Heranwachsens aus den Sporen.

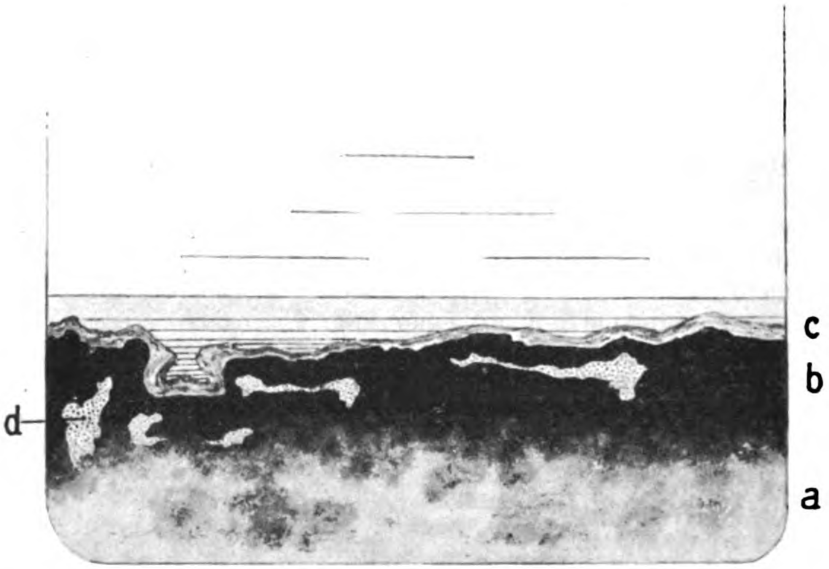


Fig. 2. Schematische Ansicht des Behälters mit dem künstlichen schwarzen Ton; a roter Ton, b schwarze Schicht, c die oberste graue Schicht, d die Purpurbakterien.

Die selten einzeln erscheinenden Kolonien bestehen aus radiär angeordneten Fäden, welche im Zentrum der Kolonie dicker sind und nach der Peripherie hin in sehr dünne, verzweigte Ausläufer übergehen. Die Form der Kolonie ist also der der Aktinomycetenkolonien sehr ähnlich (Abb. 3 u. 4).

Aus einer solchen Kolonie genommene lebende Individuen erscheinen unter dem Mikroskop als mehr oder weniger dicke, verzweigte Fäden, deren Protoplasma durch das Eisensulfid geschwärzt ist. Die Schwärzung ist in

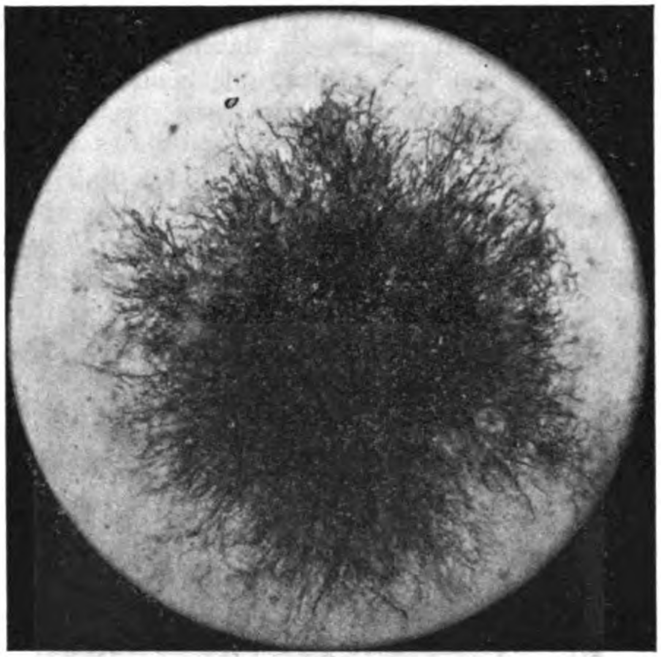


Fig. 3. Schwarze Kolonie auf der Nährgelatine von Beijerinck.

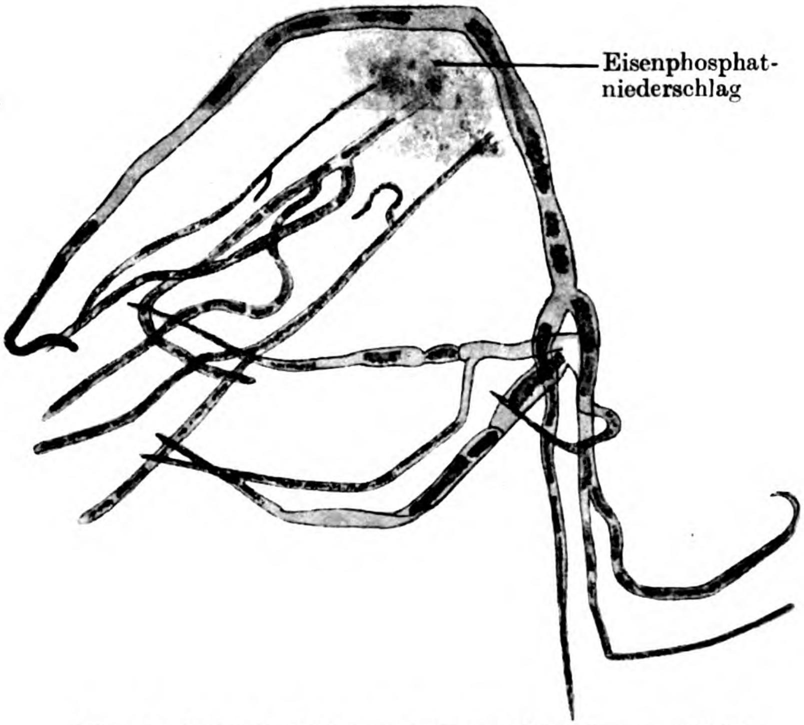


Fig. 4. Lebende Fäden mit Eisensulfid schwarz gefärbt.

den jüngsten (dünnsten) Fäden am stärksten und ziemlich gleichmäßig. Das Protoplasma der älteren (dickeren) Fäden ist nur stellenweise tief geschwärzt, was von der Plasmafragmentation abhängt. Da die Umgebung der Kolonie, wie die Abbildung zeigt, farblos ist, so beweist die Schwärzung der Fäden, daß die Sulfatreduktion im Protoplasma selbst vor sich geht. Die diffuse Schwärzung der meisten Kulturen beweist, daß der gebildete Schwefelwasserstoff von dem Protoplasma aus in das umgebende Medium nachträglich diffundiert und hier die allgemeine Schwärzung des Mediums verursacht. In einigen Fäden sind die Querwände zu sehen (ob dies aber der Actinomyces-Natur des Mikroorganismus widerspricht, muß ich unentschieden lassen). An den gefärbten Präparaten sind die Fäden natürlich dünner, aber ebenso verzweigt und im Innern fragmentiert. Die Stellung der beschriebenen Form im System vermag ich nicht zu präzisieren (Abb. 5).

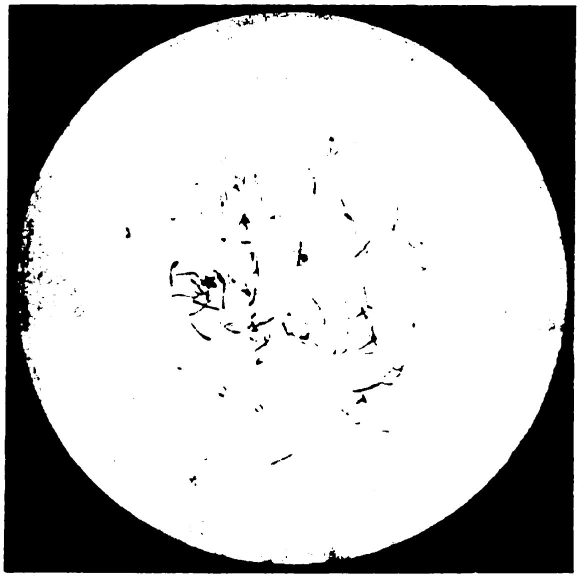


Fig. 5 Streichpräparat aus einer reinen Kultur.
Einige Fäden aus den Sporen hervorsprossend.
Einzelne verzweigte Formen.

Jedenfalls ist der von mir beobachtete Erreger der Schwefelwasserstoffbildung von der Microspira desulfuricans von Beijerinck, van Delden und Ranck morphologisch sehr verschieden. Die biologischen Eigenschaften weichen von denjenigen der Microspira ebenso starb ab. Microspira reduziert die Schwefelsäure zu Schwefelwasserstoff, trägt den aus der Schwefelsäure stammenden Sauerstoff auf die Milchsäure über und oxydiert die letztere zu Kohlendioxyd und Wasser. Die von mir untersuchte Form verursacht eine ziemlich verwickelte Milchsäuregärung. Im ersten, gewöhnlichsten Stadium dieser Gärung zerfällt die Milchsäure in Essigsäure, Kohlendioxyd und Wasserstoff. Im zweiten Stadium, welches nur unter besonderen Bedingungen stattfindet, oxydiert sich die gebildete Essigsäure zum Teil oder vollständig zu Kohlendioxyd und Wasser. Alle genannten Gärungsprodukte sind in den Kulturgefäßen nachgewiesen worden, und zwar Wasserstoff durch Knallversuch, Essigsäure durch Destillation mit Wasserdampf und (im Destillat) durch die Proben mit Eisenchlorid und Alkohol + Schwefelsäure, Kohlendioxyd durch Destillation mit der

Mineralsäure und Absorption des entweichenden Gases in Natronkalkröhren. Die im ersten Stadium der Gärung vor sich gehende Reaktion kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$4\,C_3H_5NaO_3 + Na_2SO_4 = 4\,C_2H_3NaO_2 + Na_2S + 4\,CO_2 + 4\,H_2$$

Milchsaures Natrium Essigsaures Natrium.

Um die Richtigkeit dieser Gleichung zu prüfen, wurden einige quantitative Versuche angestellt. Eine Reihe Stöpselgläser von 250 ccm Inhalt wurde mit der Nährflüssigkeit von Beijerinck (0,2 Proz. Moorsalz enthaltend) gefüllt, mit dem Impfmaterial geimpft, gut gestöpselt, paraffiniert und auf 3—5 Monate bei einer Temperatur von 25° C aufgestellt. Zur Impfung konnte ich nicht die reinen Kulturen anwenden, weil diese ziemlich rasch degenerieren und absterben. Um die Entwicklung anderer Bakterien in den Kulturen zu verhindern, bediente ich mich der etwas abgeänderten Schwefelwasserstoffmethode von van Delden. Bekanntlich zeigte van Delden, daß der freie Schwefelwasserstoff die Entwicklung der gewöhnlichen Bakterienformen stark hemmt. Um also ein möglichst reines Impfmaterial zu bekommen, ließ ich die Beijerinck sche Flüssigkeit mit dem Schlamm vermischt mehrere (bis 30) Tage bei 25° stehen. Infolge der Schwefelwasserstoffentwicklung starben die gewöhnlichen Bakterien in dieser Kultur ab. 1 bis 2 ccm einer solchen Kultur wurden dann zur Impfung in die Versuchsgläser gegeben. Nach 3 bis 5 Monaten habe ich die Gläser geöffnet und den Gehalt an CO_2 und H_2S auf folgende Weise bestimmt: Die Kulturflüssigkeit samt dem Schwefeleisenniederschlage wurde in einen Kolben gegeben, durch den ein Wasserstoffstrom innerhalb 20 Min. geleitet wurde. Dann wurden in den Kolben 50 ccm starker Salzsäure gegeben und die Wasserstoffdurchleitung unter Erwärmen des Kolbens bis zum beginnenden Sieden eine Stunde lang fortgesetzt. Die entweichenden Gase (CO_2 und H_2S) gingen durch eine Pettenkofer sche Röhre hindurch. In diese Röhre wurde vorher ammoniakalische Wasserstoffsuperoxydlösung eingegossen. Nach Beendigung der Destillation wird die Flüssigkeit aus der Pettenkoferschen Röhre in einen Kolben gegossen, zum Sieden erhitzt und man läßt dann erkalten. Der Schwefelwasserstoff oxydiert sich bei dieser Behandlung in Schwefelsäure, die Kohlensäure ist in der Flüssigkeit an Ammoniak gebunden. Die Bestimmung der Kohlensäure geschieht dann nach der Methode von Fresenius-Classen, die Schwefelsäure wird nach dem üblichen Verfahren gravimetrisch bestimmt. Die gefundenen Zahlen sind in der Tabelle zusammengestellt:

Tabelle I

No. des Versuches	CO_2 g	H_2S g	$CO_2 : H_2S$
1	0,2947	00,561	5,24
2	0,2942	00,532	5,53
3	0,6600	01,313	5,03
4	0,5571	0,1157	4,82
5	0,6380	0,1125	5,67
Summe	2,4540	0,4688	**5,23**

Der oben angeführten Gleichung zufolge soll das Verhältnis von $CO_2 : H_2S$

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

5,18 gleich sein; da der Versuch im Mittel die sehr nahe Zahl 5,23 gibt, so kann man die Gleichung als erwiesen betrachten.

In anderen Versuchen wurde zu der Beijerinckschen Flüssigkeit etwas (0,5—1,0 g) metallisches Eisen (ferr. hydrogen. reduct.) zugegeben. Unter diesen Bedingungen enthielt die Flüssigkeit niemals freien Schwefelwasserstoff. Außerdem wurde die Ansäuerung der Flüssigkeit, wie sie nach der angegebenen Gleichung stattfindet, bei Anwesenheit von metallischem Eisen auch gänzlich ausgeschlossen. Diese Unterschiede waren wahrscheinlich die Ursache der weiteren Oxydation der gebildeten Essigsäure. Qualitativ wurde die Fähigkeit der von mir untersuchten Art, die Essigsäure mit dem aus der Schwefelsäure stammenden Sauerstoffe zu oxydieren, durch einen besonderen Versuch erwiesen. Die Versuche wurden in evakuierten und zugeschmolzenen Destillationskolben ausgeführt, die Bestimmung geschah nach der beschriebenen Methode. Die Zahlen sind in der Tabelle II zusammengestellt:

Tabelle II.

No. des Versuches	CO_2 g	H_2S g	$CO_2 : H_2S$
1	0,3060	0,0743	4,12
2	0,2482	0,0588	4,22
3	0,2619	0,0676	4,02
4	0,3155	0,0848	3,72
5	0,6370	0,1490	4,28
Summe	1,7686	0,4345	**4,07**

Das Verhältnis $CO_2 : H_2S$ entspricht den Gleichungen (die Metalle sind wegen der Einfachheit weggelassen):

1. $4\,C_3H_6O_3 + H_2SO_4 = 4\,C_2H_4O_2 + H_2S + 4\,CO_2 + 4\,H_2$ (erste Phase, wie früher) und
2. $C_2H_4O_2 + H_2SO_4 = 2\,CO_2 + H_2S + 2\,H_2O$ (teilweise Oxydation der gebildeten Essigsäure).

Indem wir die Gleichungen 1 und 2 summieren, erhalten wir die kombinierte Gleichung:

$$4\,C_3H_6O_3 + 2\,H_2SO_4 = 3\,C_2H_4O_2 + 2\,H_2S + 6\,CO_2 + 4\,H_2 + 2\,H_2O$$
$$6\,CO_2 : 2\,H_2S = 3{,}88.$$

Die Versuche geben im Mittel 4,07.

In anderen Versuchen nimmt die Oxydation der Essigsäure an Umfang zu, so daß die ganze, im ersten Stadium gebildete Essigsäure der Oxydation vollständig anheimfällt. Das wird durch folgende Versuche bewiesen (die Versuchsbedingungen sind dieselben, wie in der zweiten Versuchsreihe):

Tabelle III.

No. des Versuches	CO_2 g	H_2S g	$CO_2 : H_2S$
1	1,2853	0,4139	3,10
2	0,3631	0,1324	2,74
3	0,2026	0,0871	2,33
4	0,4000	0,1207	3,31
Summe	2,2510	0,7541	**2,99**

Der Prozeß geht wahrscheinlich nach folgenden Gleichungen vor sich:

1. $4\,C_3H_6O_3 + H_2SO_4 = 4\,C_2H_4O_2 + 4\,CO_2 + 4\,H_2 + H_2S$
2. $4\,C_2H_4O_2 + 4\,H_2SO_4 = 8\,CO_2 + 8\,H_2O + 4\,H_2S$

oder, in kombinierter Form

$$4\,C_3H_6O_3 + 5\,H_2SO_4 = 12\,CO_2 + 4\,H_2 + 5\,H_2S + 8\,H_2O$$
$$12\,CO_2 : 5\,H_2S = 3{,}11.$$

Die Versuche geben im Mittel $CO_2 : H_2S = 2{,}99$, sind also ziemlich nahe der theoretischen Zahl. In dieser Versuchsreihe gehen die Verhältnisse von $CO_2 : H_2S$ in einzelnen Versuchen etwas mehr auseinander. Aber der erste Versuch dieser Reihe, mit 1 l der Flüssigkeit ausgeführt, gibt natürlich die genaueste Zahl. In diesem Versuche ist das Verhältnis von $CO_2 : H_2S$ gleich 3,10, ist also mit der theoretischen Zahl (3,11) so gut wie identisch. Außerdem wurde in dem Kolbeninhalt in diesem Versuche die Anwesenheit des Wasserstoffes direkt konstatiert. Darum läßt sich die angeführte Gleichung kaum bezweifeln.

Somit ist die von mir untersuchte Form sowohl in ihren morphologischen, als auch in ihren biologischen Eigenschaften von der Microspira desulfuricans, resp. aestuarii durchaus verschieden. Darum wollen wir zum Unterschiede von dieser Art die von mir untersuchte Form **Actinomyces pelogenes** (von pelos = Schlamm) nennen.

Die oben angeführten quantitativen Versuche beweisen, daß Actinomyces pelogenes das ganze Schwefeleisen des schwarzen Schlammes wohl einzig und allein produzieren kann.

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. Otto Hamann,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.

Krankheitserregende Bakterien und Parasiten.

Severini, G., Una bacteriosi dell' Ixia maculata e del Gladiolus Colvilli. (Ann. di bot. Vol. 11. 1913. Fasc. 3. p. 413—424. 1 Taf.)

Slawkowsky, Wilh., Die Blattlaus und deren Bekämpfung in Amerika. (Fühlings landw. Ztg. 1913. H. 13. p. 473—477.)

Wünn, Hermann, Im Unterelsaß und in der angrenzenden Rheinpfalz festgestellte Cocciden. (Ztschr. f. wiss. Insektenbiol. Bd. 9. 1913. H. 8/9. p. 255—258.)

Zacharewicz, Ed., Le mildiou en 1913 dans le Vaucluse. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1025. p. 171—174.)

Zacher, Friedrich, Die Schädlinge der Kokospalmen auf den Südseeinseln. (Arb. a. d. K. biol. Anst. f. Land- u. Fostw. Bd. 9. 1913. H. 1.)

Zacher, Friedrich, Notizen über Schädlinge tropischer Kulturen. (Der Tropenpflanzer. 1913. No. 6. p. 305—316. Mit Abbild.)

Zur Reblausstatistik. (Allg. Wein-Ztg. Jg. 30. 1913. No. 37. p. 441—444.)

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien und Parasiten.

Pflanzenschutz.

Barsacq, Joseph, La lutte contre les criquets. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1020. p. 11—15; No. 1021. p. 43—50.)

Berlese, A., Über die Bekämpfung der Maulbeerbaumschildlaus (Diaspis pentagona) in Italien. (Internat. agr.-techn. Rundsch. 1913. H. 5. p. 550—555.)

Hiltner u. **Korff**, Neue Vorbeugungs- und Bekämpfungsmaßregeln gegen den amerikanischen Stachelbeermeltau. (Prakt. Blätter f. Pflanzenbau. 1913. No. 6. p. 73—77.)

Lecomte, Antoine, Contributions à la recherche d'une bonne bouillie mouillante. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1027. p. 225—228.)

Müller, H. C. u. **Morgenthaler, O.**, Versuche über die Bekämpfung des Steinbrandes bei Winterweizen. (Fühlings landw. Ztg. 1913. H. 14. p. 481—487.)

Neumark, E., Über die Bedeutung von Bakterienpräparaten als Rattenvertilgungsmittel. (Gesundheits-Ingenieur. Jg. 36. 1913. No. 32. p. 589—590.)

Schaffnit, E., Die Bekämpfung des Hederichs. (Der Landbote. 1913. No. 22. p. 599—606. Mit Abbild.)

Thouret, A. et **Vidal, J. L.**, Traitements contre la chlorose de la vigne. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1020. p. 26—27.)

— —, Traitements contre la pourriture grise du raisin. (Rev. de viticult. Année 20. 1913. No. 1023. p. 117—118.)

Wagner, (Bonn), Neue Erfahrungen über erfolgreiche Bekämpfung des amerikanischen Stachelbeermeltaues. (Rheinische Monatsschr. f. Obst- usw. -bau. 1913. No. 7. p. 198—202. Mit 7 Abbild.)

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Linde, P., Zur Kenntnis von Cladothrix dichotoma Cohn, p. 369.

Münter, F., u. **Robson, W. P.**, Über den Einfluß der Böden und des Wassergehaltes auf die Stickstoffumsetzungen, p. 419.

Revis, Cecil, Further studies on variation in physiological activity in B. coli, p. 394.

Sawjalow, W., Über die Schwefelwasserstoffgärung im schwarzen Heilschlamme, p. 440.

Wolff, A., Zur Frage nach den Beziehungen zwischen Bakterienflora der Milch und der Weide, p. 411.

Neue Literatur, p. 447.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 12. November 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 18|19.
Ausgegeben am 6. Dezember 1913.

Nachdruck verboten.

Fruity or Sweet Flavor in Cheddar Cheese.

By **S. F. Edwards,**
Professor of Bacteriology, Ontario Agricultural College, Guelph, Canada.

With three plates.

During the summer of 1909, some work was begun on the problem ot the so-called „fruity flavor“ or „sweet flavor“ in cheese produced by some factories in the western district of Ontario. This trouble has been prevalent for a long time, is widely distributed, and in some factories has been the cause of severe losses. The flavor was not well defined in a good many cases. Occasionally there was present in the cheese a distinct pineapple or apricot or strawberry flavor, but in most cases the flavor was masked, giving an indefinite sweetish flavor. Frequently there was an astringent „after taste“, giving rise to the term „bitter flavor“ sometimes used in describing the trouble. As to the loss from this off flavor, buyers and commission men state that there is a cut in price of from one-fourth to two cents per pound, depending upon the intensity of the flavor. Aside from the off flavor itself, the defect is usually accompanied by weak body and poor texture.

From the fact that the trouble was often described as „yeasty“ flavor, and from the results of other workers along similar lines, the cause was assumed to be due to yeasts or yeast like organisms. Harrison, in 1899 and 1900 worked with an organism which he showed was the cause of bitter milk and cheese and which he named Torula amara. His results, with bibliography up to that time were published in the Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. XI. 1902. At about the same time Harding in Bull. No. 183, New York Experiment Station, 1900, reported the results of some work with sweet flavored cheese in New York state. Harding's investigation is the only one of which we have been able thus far to find record in which the trouble due to yeasts in cheese is described as sweet or fruity flavor. Hastings, twenty-second and twenty-third reports of the Wisconsin Experiment Station, 1905 and 1906, reports a widespread distribution of „lactose fermenting yeasts“ in Wisconsin, but does not appear to consider them of economic importance in the cheddar cheese industry.

In the present investigation, samples of whey were secured from twenty-five cheese factories where the flavor was prevalent and from these samples twelve distinct varieties of yeast-like organisms were isolated. Some of the yeasts (so-called) were found in the whey from more than one factory, and some factories had several varieties in the whey.

The term yeast as applied to these organisms is partly a misnomer, for with but one exception (the variety designated as A_2) we have been unable to demonstrate spore production by the usual methods. Hence, they should be considered as Torulae.

Action in Milk.

Pure cultures of the various Torulae were introduced into sterile milk, and after four days the cultures were examined for flavor by two practical cheese makers, the flavor of the cultures being described by them as follows.

(For convenience, the organisms have been designated throughout by letters and numbers which refer in the laboratory records to their factory origin.)

Yeast A_2 — Stagnant water flavor.
„ A_5 — Distinctly yeasty.
„ B_2 — Putrefactive flavor.
„ B_4 — Rotten.
„ D_1 — Typical factory off-flavor.
„ J_1 — Pure yeasty flavor.
„ J_2 — Yeasty flavor.
„ K_1 — Rancid butter flavor.
„ K_3 — Barnyard flavor.
„ O_1 — Strong yeasty flavor.
„ P_1 — Typical old sour whey tank flavor.
„ X_2 — Slightly yeasty.

Further cultures were made in sterile milk and held at a temperature of 25° C. for three days, then at room temperature for twenty-one days. The condition of the cultures is described as follows:

A_2 — at four days — Not coagulated. No odor. Marked acrid flavor with astringent "after taste".
at twenty-five days — Completely peptonized. Sour odor.

A_5 — at four days — Not coagulated. Pleasant yeasty odor. Marked alcoholic taste.
at twenty-five days — No macrosopic change. Strong yeasty odor.

B_2 — at four days — Not coagulated. No odor. Very slight astringent flavor.
at twenty-five days — No macroscopic change. No odor.

B_4 — at four days — Coagulated and partly peptonized. Supernatent fluid muddy. Very disagreeable putrefactive odor. Curd very soft. Not tasted.
at twenty-five days. — Completely peptonized. Very strong fecal odor.

D_1 — at four days — Not coagulated. No odor. Slight astringent taste.
at twenty-five days — Completely peptonized and slimy. Sour odor.

K_1 — at four days — Not coagulated. No marked odor. Marked bitter flavor, especially the "after taste".
at twenty-five days — Partly peptonized. Slight putrefactive odor.

K_3 — at four days — Not coagulated. Slight yeasty odor. No marked flavor.
at twenty-five days — No macroscopic change. Barnyard odor.

J_1 — at four days — Not coagulated. Pleasant yeasty odor. Slight alcoholic flavor.
at twenty-five days — No macroscopic change. Strong yeasty odor.

J_2 — at four days — Not coagulated. Slight yeasty odor. Very slight alcoholic flavor.
at twenty-five days — No macroscopic change. No odor.

O_1 — at four days — Not coagulated. No masked odor. Slight acrid flavor.
at twenty-five days — Soft curd. Strong yeasty odor.

P_1 — at four days — Very soft curd with peptonization beginning. Slight yeasty odor. Slight alcoholic flavor.
at twenty-five days — Completely peptonized. Marked pineapple odor, also alcoholic. "Old sour whey tank odor".

X_2 — At four days — Not coagulated. No marked odor or flavor
at twenty-five days. — No data.

Action in Cheese.

Three lots of experimental cheese, twenty-seven cheese in all, have been made, using cultures of the torulae in the milk from which the cheese were made. The cheese were made in the College cheese factory, and ordinary factory conditions were simulated as closely as possible.

The first lot consisted of three cheese made December 15th 1909, kept in an ordinary curing room and judged at three different periods, each time by practical cheese men.

The cheese are designated by letters corresponding to the yeast varieties used as starters.

The results as described by the judges follow:

A_5 — January 7, 1910 — Rank flavor.
April 1, 1910 — Rough texture. Flavor not clean. Such as many times met with in factories.
June 30, 1910 — Bitter Flavor.
D_1 — January 7, 1910 — Weak body. Flavor not clean.
April 1, 1910 — Pasty texture. Whey flavor. Bitter taste. Typical of H. factory[1]).
June 30, 1910 — Fermented and stinking flavor. Bitter. Rotten.
K_3 — January 7, 1910 — Pronounced yeasty flavor.
April 1, 1910 — Pasty texture. Flavor not clean.
June 30, 1910 — Flavor bitter. Astringent.

The results in these three cheese would tend to show that the off-flavor caused by the torulae develops early and does not pass off as the cheese gets older.

Cheese made in the College factory at the same time as the above, without cultures of the torulae were clean in flavor and remained so.

A second series of cheese were made in February and March, 1910, again using torulae cultures as starters. Ten cheese were made in this series, between February 18th and March 2nd. These cheese were kept in the College cheese curing room, and were judged April 1st by the Dairy Instructors of Western Ontario, June 30th by Mr. Herns, Chief Dairy Instructor for Western Ontario, and Mr. McKay, Instructor in Cheesemaking at the College, and January 5, 1911, by Mr. McKay. The results follow:

A_2 — April 1, 1910 — Shows some mottles. Not clean in flavor. Very pronounced acid taste.
June 30, 1910 — Astringent taste. Stinking flavor.
January 5, 1911 — Old rotten flavor. Texture poor.
B_2 — April 1, 1910 — Some mottles. Slight fruity flavor. Strong bitter taste.
June 30, 1910 — Fruity. Bitter.
January, 5, 1911 — "Typical old bitter stink." Texture good.
B_4 — April 1, 1910 — Some mottles. Bad flavor. Weak body.
June 30, 1910 — Very salvy. Fermented. Fruity. Dirty.
January 5, 1911 — Dirty and rancid. Greasy texture.
J_1 — April 1, 1910 — Weak body. Marked fruity flavor. Color a little off.
June 30, 1910 — Very bad fruity and rotten flavor. Bitter taste. Typical of S. factory.
January 5, 1911 — Very dirty. "A stinker".
J_2 — April 1, 1910 — Sour flavor.
June 30, 1910 — Deep, very bitter taste. Fruity. Texture salvy.
January 5, 1911 — Old flavor. Very bad taste.
K_1 — April 1, 1910 — Bad fruity flavor. Like fruity flavor met with at factories. Worst tasting of lot.
June 30, 1910 — Very bitter taste. Fruity. Fermented.
January 5, 1911 — Dirty. Stable flavor.
O_1 — April 1, 1910 — Weak body. Bad taste.
June 30, 1910 — Off flavor. Fruity. Bitter taste.
January 5, 1911 — Dirty flavor.
P_1 — April 1, 1910 — Characteristic texture of bitter flavored cheese. Bad fruity flavor. Fruity taste. "A bad one".
June 30, 1910 — Decidedly bitter taste. Slightly fruity. Rotten flavor.
January 5, 1911 — Very fluity. Most fruity of the lot.

---

[1]) This factory pasteurized the whey in 1910 and had no trouble from fruity or bitter flavor.

X_2 — April 1, 1910 — Beginning to develop mottles. Marked yeasty flavor. Typical flavor of N.---- section.
June 30, 1910 — Typical off-flavor often found in old cheese at high temperature. Rotten-egg flavor.
January 5, 1911 — Bad, dirty flavor.

When judged January 5th, all the cheese tended to a rancid flavor.

Results with these cheese also indicate that the organisms produce the bad flavor early, and that the flavor gets worse rather than better as the cheese ages.

Effect of Cold Curing on Fruity Flavor.

A third series of cheese was made, using cultures of part of the torulae, in August, 1910. In this series the object was to note whether cool curing had any effect in preventing the fruity flavor. Six varieties were used, and two cheese were made from the same lot of milk, the cheese being handled in exactly the same manner. As soon as the cheese were all made, one of each pair was placed in a cool curing room at Woodstock, Ontario, the other remaining in the College curing room at ordinary temperature. Two normal cheese were made at the same time; one being kept in Woodstock cool curing room, the other in the College curing room, to serve as controls on those in which torulae were present.

Of these lots of cheese, those in the cool curing room were judged the last of December by a prominent cheese buyer and one of the dairy instructors; and those in the College curing room were judged January 5th, 1911, by Mr. McKay of the College.

The results in the two lots were described as follows:

B_4 — Cool curing room — Fermented whey flavor. Body fair.
B_4 — Warm curing room — Rancid. Dirty. Texture salvy.
J_1 — Cool curing room — Strong fermented flavor. Body weak.
J_1 — Warm curing room — Dirty whey tank flavor. Texture coarse. Extremely dirty flavor.
J_2 — Cool curing coom — Very bad off-flavor. Texture sticky.
J_2 — Warm curing room — Rancid and dirty. Texture sticky.
P_1 — Cool curing room — Strong fermented flavor. Body salvy.
P_1 — Warm curing room — Very yeasty and rotten. Texture salvy.
X_2 — Cool curing room — Not clean in flavor. Texture gritty.
X_2 — Warm curing room — Slightly yeasty. Texture sticky.
Normal cheese — Cool curing room — Slightly off flavor. Good texture. Best flavor of lot.
Normal cheese — Warm curing room — Flavor good. Texture good.

In this third lot of cheese, there was again demonstrated the fact that the torulae originally found in factory whey tanks, were able to cause undesirable flavors in the finished cheese, even under cool curing conditions, and that when the flavor is once produced in the cheese, it does not pass off. This persistence of flavor is significant in the light of the data in the tables on viability of the torulae in the cheese, which show that in most cases, the organisms themselves die out, but that the active substance, whatever it may be, remains and even may cause an increase in the intensity of the off flavor.

Cultural Characters of the Torulae.

Cultures of these organisms have been retained in the laboratory and cultural characters have been observed from time to time. Not much attention has been given to morphology, sole dependence for differentiating the varieties having been placed on cultural and biological characters. A summary of these characters is given in the subjoined table.

The Cultural Characters of Torulae from Whey.
+ indicates positive results. Blanks indicate no action.

	Ferments[1])				Produces acid in						Reducing sugars from				Peptonizes milk	Liquefies wort gelatin[2])	Indol in Dunham, 20 days	Indol in Uschinsky + peptone	Ammonia in nitrate broth	Alkali in litmus milk
	Dextrose	Saccharose	Lactose	Maltose	Dextrose	Saccharose	Lactose	Maltose	Raffinose	Mannit	Saccharose	Raffinose	Starch	Mannit						
A_2					+								+		+	+		+		
A_5	+		+			+	+				+	+			+	+	+	+	+	
B_2	+	+			+	+			+		+	+			+	+	+	+	+	+
B_4	+	+			+	+			+	+	+	+			+	+	+	+	+	
D_1															+		+	+	+	+
J_1	+	+	+		+	+	+					+				+	+	+	+	
J_2	+					+		+			+				+	+	+	+	+	+
K_1	+	+		+		+		+	+			+			+	+		+		
K_3	+	+			+	+	+				+	+						+		+
O_1	+				+		+		+		+	+				+		+		+
P_1	+	+	+		+	+	+					+			+	+		+	+	
X_2											+	+				+				
Control																				

All of the organisms made scanty growth, in Cohn. D_1, J_2, P_1, X_2, made scanty growth in Uschinsky, the others none.

Organisms A_2, J_1, P_1, produced a marked pineapple flavor in wort agar plates and A_5 and J_2, marked strawberry flavor in the same medium.

Culture Media Used.

Aside from the media as indicated in the biometric table, those most commonly used have been gelatin wort and plain wort, although whey, whey gelatin and yeast water gelatin have all been used with successful results.

For general work, gelatin wort is as favorable as any of the others.

Viability of Whey Torulae.

No especial work has been done on this point, other than observations made as subcultures were made from time to time. The cultures originally isolated from the whey samples in 1909 were held in gelatin wort in Freudenreich flasks at room temperature, and transplants to wort made in March 1913 from the originals showed vigorous growth in every variety, after a lapse of three years and four months.

Persistence of Whey Torulae in Cheese.

A limited amount of work was done to determine the viability of the various torulae in cheese of two series as shown in the following tables. The counts were made from plates of suitable dilutions on gelatin wort. The figures given are per gram of cheese as sampled.

---

[1]) Does not ferment raffinose, glycerine, mannit, inulin, starch.

[2]) Liquefaction was slow, in some cases occuring only after a number of months.

Persistence of Whey Torulae in Cheese.

Table I.

Yeast	Cheese Made	Count Apr. 1, 1910		Count Mar. 23, 1910		Count Jan. 6, 1911	
		Total	Yeasts	Total	Yeasts	Total	Yeasts
A_2	Feb. 18, 1910	39,464,000	0	205,580,000	0	286,200	200
A_5	Dec. 15, 1909	63,600,000	0	82,680,000	100,000	3,577,000	0
B_2	Feb. 18, 1910	38,200,000	360,000	148,969,000	0	3,021,000	0
B_4	Feb. 22, 1910	35,600,000	100,000	141,560,000	200,000	4,197,600	0
D_1	Dec. 15, 1909	30,528,000	0	84,435,000	0	51,100	300
J_1	Feb. 23, 1910	57,240,000	0	108,120,000	100,000	2,035,000	0
J_2	Feb. 22, 1910	45,700,000	100,000	91,348,000	90,000	4,420,000	200
K_1	Feb. 25, 1910	81,408,000	150,000	81,680,000	100,000	4,134,000	0
K_3	Dec. 15, 1909	50,260,000	0	235,120,000	0	3,211,800	550
O_1	Mar. 2, 1910	92,800,000	0	154,740,000	100,000	1,272,000	100
P_1	Feb. 23, 1910	50,980,000	35,000	169,176,000	1,800,000[1]	47,700	0
X_2	Mar. 2, 1910	159,000,000	0	87,958,000	0	954,000	0

Table II.

Yeast	Cheese Made	Count Aug. 19, 1910		Count Jan. 6, 1911	
		Total	Yeasts	Total	Yeasts
J_1	Aug. 17, 1910	116,000,000	450,000	5,867,000	0
B_4	Aug. 18, 1910	28,000,000	400,000	11,448,000	0
J_2	Aug. 19, 1910	32,000,000	200,000	37,206,000	100
P_1	Aug. 18, 1910	30,000,000	750,000	6,360,000	0
X_2	Aug. 19, 1910	24,300,000	150,000	14,310,000	0
Normal A	Aug. 20, 1910	60,000,000	0	4,661,000	0
Normal B	Aug. 20, 1910	—	0	8,586,000	0

From these results it would appear that in most cases the torulae die out eventually, although some were alive at the end of a year.

Thermal Death Point.

The dermal theath point for all the twelve varieties studied lies between 65° C. and 70° C. with an exposure of ten minutes. The comparatively low thermal death point gives an indication of the means by which the off flavors caused by these organisms may be controlled in factory practice. It has repeatedly been shown by factory experience that pasteurization of the whey in the whey tanks at the factory is a certain method of eradication and prevention of trouble from this source.

The chemistry of the flavor production has not yet been worked upon, but the flavor is obviously due to the formation of esters during the progress of the fermentation.

The author wishes to express his appreciation of the courtesy and cooperation on the part of Mr. McKay of the College cheese factory, and others, who aided in carrying on the investigation.

---

[1] Distinct fruity flavor in plate.

The morphology of the cells and giant colonies are shown in the accompanying plates.

Laboratory of Bacteriology, Ontario Agricultural College,
Guelph, Canada.

Explanation of Plates.

Plate I. Whey torulae from twenty-four hour old cultures in beer wort × 850.

Plates II and III. Colonies on beer wort gelatin after incubation for ten days at 20° C. × 5.

Nachdruck verboten.

A Study of the Formation of Nitrates in various Types of Virginia Soil.

I.

Preliminary Report.

[Virginia Agricultural Experiment Station, Blacksburg, Va.]

By **Edwin Broun Fred.**

The increase in nitrates in soils protected from leaching has been reported by numerous investigators, notably Koch[1]). He found that the nitrate content gradually increased, more the first year than later on. With this in mind experiments were planned to study the rate at which nitrogenous compounds in various types of Virginia soils are converted into nitrates.

The importance of this process for the growth of higher plants is too well known to need further discussion, for it is generally conceded that nitrate is the most available form of nitrogen for higher plants.

A comparison of the value of nitrogen in the form of nitrates, and of other compounds for higher plants, may be found in the reports of the various agricultural experiment stations.

Publications from Rothamsted and from North Carolina Experiment Station give a historical review of this subject[2]).

The results of many investigators show that nitrogen in various forms may under certain conditions, be utilized directly by higher plants. For example, certain crops, corn, rice, etc., can use ammonia direct. That nitrate is the chief form in which plants take up nitrogen is very probable. Because in most soils[3]), the bacteria present quickly converts the nitrogenous compounds into nitrates. Plant growth is greatly retarded if all plant food save nitrogen is present in the form of nitrates. This diminished plant growth in the absence of nitrates is clearly seen in soils where the nitrate supply is removed or greatly decreased by the presence of organic matter as paper[4]).

---

[1]) Koch, Alf., Versuche über die Salpeterbildung im Ackerboden. (Journal f. Landwirtsch. 1911 [Festschrift]). See references in this paper.

[2]) Hutchinson and Miller, Journ. Agr. Scienc. Vol. 3. 2. 1909. p. 193; Vol. 4. 3. 1912. p. 299.) — Stevens and Withers, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 187. — Niklewski, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 388.

[3]) Stevens and Withers, Loc. cit. An exception to this is found in the above report.

[4]) Fred, E. B., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1911. p. 34.

As long as cellulose is present in the soil there is hardly a trace of nitrate nitrogen. It is probable that this substance produces other harmful changes; investigations along this line are now underway.

From this it may be seen that a study of the cycle of the nitrogen element in soil is not only interesting from a purely scientific point, but is also of practical importance. If the nitrate forming power of a soil is low then such nitrogenous fertilizers as blood meal and ammonium sulphate will remain in the soil a long time before being oxidized to nitrates. In the case of a nitrate feeding crop the rate of this process will determine the time to add such fertilizers. Along with this investigation of nitrification the question of nitrate holding power of the soil naturally arises. In a soil with not over one half water of saturation present do nitrates remain as such for a long period[1])? The much feared process denitrification (loss of nitrates) has been shown to be greatly exaggerated[2]). Losses by chemical processes have been reported but only under very specialized conditions[3]). In order to become better acquainted with the gain and loss of nitrates in cultivated soils this study was planned.

The work was divided into four main studies:

1. A comparison of nitrification in various types kept in a greenhouse, with a difinite water content, and in the same types, when kept out of doors exposed to the usual temperature and rain fall.
2. A study of the rate of nitrification in these same soils with 0.2 per cent of ammonium sulphate added.
3. The effect of sand and of lime on the accumulation of nitrates in clay soils.
4. The nitrate-holding power of these soils in protected and unprotected series.

The five types of soil used in these experiments were taken from different parts of the State. These are classified by the U. S. Bureau of Soils as follows:

Type 1. Albemarle. — This is known as Cecil clay. The sample used for these experiments was taken from virgin soil near Crozet. This soil is well adapted for growing fruit and for general farming.

Type 2. Appomattox Chocolate. — This also is known as Cecil clay, but it is much heavier than the clay of Albemarle. Because of the brownish red color it is called Appomattox Chocolate. It is regarded as the best type of soil for general farming in this area, and is especially adapted to the production of heavy export tobacco. The sample studied was taken from virgin soil near Appomattox C. H.

Type 3. Appomattox Light. — This is classified as Cecil sandy loam. It is gray in color and of medium texture. It is not as productive as the Appomattox Chocolate, but when fertilized, good crops of heavy export tobacco may be grown. The sample used in these experiments was taken about 5 miles from Appomattox C. H.

Type 4. Blacksburg. — This is known as Hagerstown Silt loam. The soil is well adapted to general farming and is especially noted for blue-

---

[1]) Koch, Alf. u. Pettit, H., Über den verschiedenen Verlauf der Denitrifikation im Boden und in Flüssigkeiten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 335.)

[2]) Wagner, Deutsch. Landw. Presse. Bd. 22. 1895. p. 83.

[3]) Vogel, Neue Beobachtungen über das Verhalten von Nitrat im Ackerboden. (Landw. Vers. Stat. Bd. 78. 1912. p. 265—301.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

grass. This sample was taken from an unfertilized plot at the Virginia Experiment Station.

Type 5. Norfolk. — This is classified as Norfolk Fine sand. It is dark brown sandy loam, of open texture with many grains of coarse sand present. It is the most extensive trucking soil in this area. This sample was taken from an unfertilized plot at the Virginia Truck Experiment Station.

For a more complete description of the soil types employed in this investigation see an earlier bulletin from this Station[1]).

The soil for all of the pot experiments was brought to the laboratory, allowed to dry partially, sifted, and then thoroughly mixed. After removing samples for analysis, the soil was filled into pots. Thirty-eight galvanized iron pots, Wagner type, of 12 kilo capacity were used for the greenhouse series. This is known as Series I. The group kept out of doors consisted of thirty galvanized pots of 12 kilo capacity, with holes in the bottom. All the salts were added in the powdered form, thoroughly mixed, and the soil moisture raised to one half of the total water holding capacity of the soil. This water content was maintained throughout the year with the protected series, while the other group did not receive any water except the natural rain fall. Series I was kept in the green house at a temperature of about 22° C during the winter and slightly warmer in the summer. Series II was kept in an open lot a few feet away from the greenhouse. As it was unusually cold the soil in this group remained frozen a good part of the winter.

Methods.

Total nitrogen analyses were made by the modified Gunning method. The nitrates were determined by the reduction method[2]) using 5 grams of reduced iron dust and 10 grams of zinc dust in an alkaline solution. To extract the nitrate, 2.000 cc. of water and 1000 grams of soil were shaken together and allowed to stand 2 hours before filtering.

The average nitrogen and nitrate content of these soils at the beginning of this experiment is given below.

Table 1. Nitrogen and Nitrate Nitrogen Content of Soils.

	Mgs. of Nitrogen in 100 gms. of Dry Soil	Mgs. of N. as Nitrate per 100 gms. of Dry Soil
Albemarle	110.0	0.78
Appomattox Chocolate	104.1	1.02
Appomattox Light	60.5	0.45
Blacksburg	94.0	0.70
Norfolk	102.6	2.10

The unusually small amount of nitrate present in some of these soils is perhaps due to heavy rains just before samples were taken. In this preliminary report the amount of nitrate is always expressed as mgs. of N. per 100 gms. of dry soil.

---

[1]) Ellett, W. B. and Hill, H. H., Bull. 200 Virginia Agr. Expt. Stat. 1912.

[2]) Seydel u. Wichers, Über die Genauigkeit von Nitratbestimmungen. (Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 24. 1911. p. 1—9.)

These investigators found that the reduction method is very accurate up to about 40 Mgs. of N. as nitrate.

Nitrate Formation in Protected and Unprotected Soil.

All of these experiments were begun on the 6th of November, 1911 and continued until this same date, 1912. Total nitrogen analyses were made at the beginning and at the end of the experiment. Nitrates were determined at definite intervals during the year.

Untreated Soil.

In table 2 are recorded the results obtained from periodic examination of the various soils when kept in the greenhouse and out-of-doors. The gradual accumulation of nitrate nitrogen is clearly seen from the figures in this table.

Table 2. The effect of Temperature and Moisture on Nitrification in Various Types of Virginia Soil. Protected and unprotected.

Time of Analysis	Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. Dry Soil									
	Albemarle		Appo. Choc.		Appo. Light		Blacksburg		Norfolk	
	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors
Nov. 6, 1911	0.78	0.78	1.02	1.02	0.45	0.45	0.70	0.70	2.1	2.1
Apr. 6, 1912	4.6	2.55	7.8	4.3	5.5	3.7	5.6	3.6	9.2	3.9
May 20, 1912	6.5	3.7	9.8	3.4	5.9	3.04	6.3	3.3	9.7	3.11
July 6, 1912	6.8	3.0	9.2	4.1	6.2	3.83	6.3	4.18	10.14	0.99
Sept. 6, 1912	8.5	3.0	10.2	4.48	6.1	2.99	5.8	3.14	9.1	2.34
Nov. 6, 1912	9.4	0.85	10.7	0.82	6.5	0.76	6.7	1.1	9.0	0.9

As seen under column headed „Greenhouse", there is a gradual increase in nitrate in the protected series. This varies with the different types of soil but is in every case marked. In the out door series this increase was not so noticeable, and after the heavy rains in early fall, the nitrate content was even lower than at the beginning.

Table 3. The Accumulation of Nitrates in Series I. Greenhouse.

Soil Type	Mgs. of N. as Nitrate per 100 gms. Dry Soil		
	At End	At Beginning	Increase
Albemarle	9.4	0.78	8.62
Appo. Chocolate	10.7	1.02	9.68
Appo. Light	6.5	0.45	6.05
Blacksburg	6.7	0.70	6.00
Norfolk	9.0	2.10	6.10

The gradual increase in nitrate nitrogen extends throughout the entire year, although the rate is more rapid the first 6 to 8 months than it is later. Unfortunately, there was not enough soil left to continue this investigation.

However, as shown by the results of other investigations[1]), this increase is not so great after the first year.

It has been shown by the results of many investigators that when leaching is prevented the nitrates in the soil tend to accumulate. This has been used to explain the good effect that frequently follows bare fallowing. Where the losses by leaching or denitrification are excluded it is interesting to note the amount of nitrate actually present at different times for a period of many months. This is clearly seen from the results of table 3.

Lipman[2]) found that when nitrates are allowed to accumulate and not taken up by plants, leached out, or denitrified, there are certain limitations and after this is reached the nitrate content begins to decrease. This decrease, where the above mentioned factors are excluded, he thinks is no doubt due to the conversion of the nitrate into protein nitrogen by microorganisms. In only one case, that of Norfolk soil, there was a slight decrease in nitrate nitrogen.

Koch found an increase of 3.38 mgs. in nitrate nitrogen for the first 9 months. The next 11 months showed an increase of only 1.39 mgs. The gain in nitrate nitrogen in Virginia soils is greater. The maximum in these experiments, was noted in Appomattox Chocolate and the minimum with Blacksburg.

When calculated as per cent of the total nitrogen of the different soil types, this gain becomes even more striking. For example; the Albemarle soil shows an increase of 8.62 mgs. of nitrate nitrogen and contains only 110 mgs. of total nitrogen, or 7.84 per cent of the total nitrogen.

Appomattox Chocolate, 9.68 mgs. with 104.1 mgs. of total nitrogen or 9.4 per cent. Appomattox Light, 6.05 mgs. with 60.5 mgs. of total nitrogen, or 10 per cent. Blacksburg, 6.00 mgs. with 94.0 mgs. of total nitrogen, or 6.39 per cent. Norfolk, 6.90 mgs. with 102.6 mgs. of total nitrogen, or 6.73 per cent. These figures show that a large per cent of the total nitrogen is nitrified when the soils are kept moist and protected from leaching. In the unprotected series (pots with open bottoms,) the reverse is true. After one year there is little change in the nitrate content. These is perhaps less present than at the beginning. About 1 mg. is the average amount of nitrate nitrogen present in 100 gms. of Virginia Soil. From the above data it will be seen that by protection from leaching this amount may be increased 6 to 10 times according to the type of soil.

If nitrification goes on so rapidly in the protected soils, it is reasonable to assume that under field conditions a similar increase will occur, provided the rain fall is not too heavy. To study this point, experiments in nitrate formation in pots and in the field soil from the Virginia Experiment Station were carried out. The soil for the pot experiments was taken from the same plot. This was kept free from all vegetation and cultivation. The results are given below.

Table 4. Nitrate Formation in the Field.

Nov. 6, 1911	0.85	Mgs.	per	100	gms.	Dry	Soil
May 20, 1912	2.7	„	„	100	„	„	„
June 20, 1912	4.6	„	„	100	„	„	„
Aug. 3, 1912	4.9	„	„	100	„	„	„
Sept. 10, 1912	2.2	„	„	100	„	„	„

---

[1]) Koch, A.. Loc. cit.

[2]) Lipman, J. G., N. J. Sta. Rept. 1908. p. 117—122. — Lipman and Brown, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 631—632.

The results of these analyses confirm those of the Greenhouse series. The nitrate content increased in the field soil almost as much as it does in protected pots. Unfortunately it was not possible to run similar tests on the other soil types. It is well known that thorough cultivation increases the water holding power of the soil and thereby the nitrate accumulation. This may in part explain the good effect of fallowing. An increase in nitrate during the dry summer months is reported as very noticeable in the black soils of Russia[1]).

A comparison of the nitrifiying efficiency of these types with the humus content shows that soils high in this substance are generally rapid nitrifiers. This confirms the results of earlier workers[2]).

Table 5. Relation of Nitrate Formation to Humus and Lime Content of Soil[3]).

No.	Soil Type	Humus Per Cent	Lime Per Cent	Mgs. of N. as Nitrate per 100 gms. of Dry Soil	
				After 5 months	After 12 months
1	Albemarle	0.91	.085	4.6	9.4
2	Appo. Choc.	1.01	.202	7.8	10.7
3	Appo. Light	0.94	.242	5.5	6.5
4	Blacksburg	0.81	.76	5.6	6.7
5	Norfolk	1.05	.67	9.2	9.0

The amount of nitrate found after 5 and 12 months is generally highest in the case of the soils containing the most humus. This is not always true, for example, in the case of Blacksburg Soil.

Nitrate Formation in Fertilized Soils.

In order to bring out more clearly the nitrate forming power of the various soils, a study of nitrification in soils to which ammonium sulphate has been added was undertaken. The conversion of the ammonia in this compound into nitrate is especially interesting because of the value of this substance as a commercial fertilizer.

A comparison of the rate of nitrate formation from ammonium sulphate in different soil types has been studied by a great number of investigators[4]).

In this investigation the same soil types were used as in the previous experiment. To each soil 0.2 per cent of ammonium sulphate was added and the rate at which this is converted into nitrate studied. In all, eight periodic analyses were carried out during the course of the year. The table below gives the results of these analyses.

The various soils show a very different rate of nitrate formation. The periodic course of nitrification is widely different in the soils studied, as well as the total nitrate formed. The Albemarle and Appomattox Light soils form nitrates very slowly. The former perhaps on account of the deficiency in

---

[1]) Koch, A., Loc. cit. p. 91.

[2]) Withers and Fraps, North Carolina Rept. 25. 1913. p. 31. — Buhlert u. Fickendey, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 404. Müntz u. Tainé, Compt. rend. T. 142. 1906. p. 430. — Niklewski, B., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 388.

[3]) Analyses taken from Bull. No. 200. Virginia Exp. Stat.

[4]) See, Löhnis, Handb. d. landwirtsch. Bakteriologie. 1909.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

lime, this will be discussed later on. The last named soil is very deficient in plant food.

Table 6. The Effect of Temperature and Moisture on Nitrification in Various Types of Virginia Soils with Ammonium Sulphate Added. Protected and unprotected.

Time of Analyses	Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. of Dry Soil									
	Albemarle		Appo. Choc.		Appo Light		Blacksburg		Norfolk	
	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors
Nov. 6, 1911	0.78	0.78	1.02	1.02	0.45	0.45	0.70	0.70	2.1	2.1
Dec. 6, 1911	1.9	—	9.1	—	1.05	—	4.7	—	5.5	—
Jan. 20, 1912	4.0	0.99	12.3	2.4	2.7	0.91	6.8	1.84	8.3	1.64
Mar. 6, 1912	11.7	—	30.1	—	3.8	—	16,4	—	24.2	—
Apr. 6, 1912	16.5	5.15	30.5	9.1	13.2	3.0	24.22	5.3	31.7	5.1
May 20, 1912	23.6	9.3	31.2	9.0	15.6	5.61	—	7.2	33.8	5.0
July 6, 1912	23.0	5.25	31.7	6.3	17.7	6.16	26.8	6.9	33.5	1.34
Sept. 6, 1912	25.0	3.50	34.7	6.22	22.2	3.96	29.7	5.69	33.6	2.37
Nov. 6, 1912	25.7	1.25	34.2	1.02	29,2	0.85	35.1	1.2	34.5	0.95

For the first month after this fertilizing was added there was very little change in the nitrate content. After 10 weeks the gain in nitrates was quite noticeable. In one case, Appomattox Chocolate, as much as 12,3 mgs. of nitrate nitrogen was found. A classification of these soils according to rate of nitrate formation is given below.

The most rapid nitrifier is placed first and the other types in their respective order.

1. Appomattox Chocolate, 2nd-Norfolk, 3rd-Blacksburg, 4th-Albemarle, 5th-Appomattox Light.

With a few exceptions the same order is maintained throughout the year as in the case of the unfertilized soils. The general course of nitrate formation is clearly seen from the figures in this table.

In the series kept outdoors, the ground remained frozen nearly the entire winter and very little nitrification was noted. Analyses 20 weeks after the beginning show as follows:

1. Albemarle	5.15	mgs.	of	nitrate	nitrogen	per	100	gms.	of	Dry	Soil
2. Appo. Choc.	9.10	„	„	„	„	„	100	„	„	„	„
3. Appo. Light	3.0	„	„	„	„	„	100	„	„	„	„
4. Blacksburg	5.3	„	„	„	„	„	100	„	„	„	„
5. Norfolk	5.1	„	„	„	„	„	100	„	„	„	„

As compared with the rate of nitrate formation in protected series, this is very small.

A review of table 6 shows that Ammonium sulphate in Appomattox Chocolate soil is rapidly converted into nitrates, while in Appomattox Light this process is very much slower.

The Effect of Sand and Lime on Nitrification in Clay Soils.

The favorable effect of lime on nitrate formation has been reported by numerous investigators(1).

---

(1) Wohltmann, F. Fischer u. Schneider, Journ. f. Landw. 52. 1904. p. 97. These investigators found an enormous increase in nitrification when lime is added. With a control equal to 100 the lime treated culture was found equal

This is especially true in the case of heavy clay soils and for this reason the two Cecil clay types, Albemarle and Appomattox Chocolate were studied. Along with the lime experiments a similar series were treated with sand. These experiments were planned in order to see if the increased aeration and improved physical condition caused by the addition of sand would be followed by very much more rapid nitrification.

That nitrification goes on more rapidly in sandy than in clay soil provided the proper water content is maintained, can be seen from the results of Dehérain and Tuxen[1]) and others. That the addition of sand to a soil rich in plant food increases the rate of nitrification has been reported by Reitmair[2]).

On the other hand Prichard[3]) reports that the addition of clay (10 per cent) to a sandy soil produces a harmful effect.

One of the many good effects produced by lime is generally conceded to be due to an improvement in mechanical condition. For this reason it was thought best to test the effect of sand and lime on these two soil types. The lime was added as CaO at a rate of 0.1 per cent or about 1.3 tons per acre foot. The sand added was one-fourth by weight. Ammonium sulphate 0.2 per cent was added in order to show more graphically the effect of these substances on nitrification. The following table shows the periodic nitrate formation in these soils, when treated and untreated. It gives a clear view of the effect of these two substances on nitrification.

The soils treated with sand and lime respond in a very marked manner. The rate of increase in nitrification in the sand treated soil is at first somewhat slower, due no doubt to the dilution.

As the sand used in these experiments is virtually free of all organic matter, (washed sand from the sea shore) there is a decrease in plant food one fourth in all pots to which this was added. This no doubt explains the slight retarding influence noted at first. The decrease in plant food is best seen by referring to tables 9 to 13, at the end of this publication. Total nitrogen analyses bring this point out very clearly. These results as a whole show that when sand is added to a heavy clay soil, as Albemarle or Appomattox Chocolate, the physical conditions of the soil are improved, and parallel with this nitrification is increased. This answers the question mentioned above, namely: „Does sand when added to a heavy clay soil improve the conditions that favor nitrification?“

The influence of lime is marked. The increase in this case is far beyond the amount of nitrate that it is possible to obtain if all of the nitrogen of the ammonium sulphate is converted into nitrate. The ammonium salt used in these experiments was not pure and did not analyze but 37 mgs. of N. instead of 40. If 75 to 90 per cent of the N. of ammonium sulphate is the maximum amount recovered, the gain in nitrate where lime has been added is much too great to be accounted for in this way[4]). A part of the nitrogen

---

to 601. — Bonáme, Rep. Ann. Stat. Agron. Mauritius. 1896. p. 74. — Dumont, Compt. rend. T. 125. 1897. p. 469. — Withers and Fraps, Journ. Americ. Chem. Soc. 23. 1901. p. 318. — Löhnis, Loc. cit. p. 752. — Koch, Journ. f. Landwirtsch. 1911. p. 65.

[1]) Tidskr. f. Landökon. l. 2. 1884. p. 201.

[2]) Zeitschr. f. d. landw. Vers.-Wes. in Österreich. 11. 1908. p. 215.

[3]) Compt. rend. Paris. T. 109. 1889. p. 445—447.

[4]) Wagner, Arb. d. Deutsch. Landwirtsch.-Gesellsch. H. 80. — Ehrenberg, Die Bewegung des Ammoniakstickstoffs in der Natur. [Habilitationsschr.] 1907.

of the soil was no doubt converted into nitrate nitrogen. Both sand and lime show the most marked effect in the case of Appomattox chocolate soil. This is perhaps due to the very heavy nature of this soil type.

Table 7. Nitrate Formation in Albemarle and Appomattox Chocolate Soils with Lime and Sand Added.

Soil	Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. of Dry Soil								
	11/6 1911	12/6 1911	1/20 1912	3/6 1912	4/6 1912	5/20 1912	7/6 1912	9/6 1912	11/6 1912
1. Albemarle	0.78	1.9	4.0	11.7	16.5	23.6	23.0	25.0	25.7
2. Albemarle plus ¼ sand	0.56	2.0	4.1	9.7	16.3	19.1	25.3	27.8	28.4
3. Albemarle plus 0.1 per cent lime	0.78	2.4	18.0	23.7	—	39.0	39.5	40.5	40.5
4. Appo. Chocolate	1.02	9.1	12.3	30.1	30.5	31.2	31.7	34.7	34.2
5. Appo. Choc. plus ¼ sand	0.85	6.65	9.8	28.9	31.3	38.7	38.0	38.1	38.9
6. Appo. Choc. plus 0.1 per cent lime	1.0	11.5	26.3	37.3	38.2	40.7	42.0	43.4	43.8

The conclusions to be reached from the results of these experiments are:

1. Sand in some way, perhaps by improving aeration, causes an increased accumulation of nitrate.
2. Lime increased the nitrifying power of these soils enormously.

The Gain or Loss of Nitrates in Protected and Unprotected Soil.

The results of late investigators, for example, Koch[1]), and his followers, have shown that in an ordinary soil protected from leaching, with a moderate amount of water present, (not over 25 per cent), very little loss of nitrates as due to denitrification occurs. It was thought best to repeat in part, these experiments and at the same time to study the changes that nitrates undergo when kept for a long time in the same type of soil. As in the previous series, periodic nitrate determinations were made. The experiment was so arranged as to have about 40 mgs. of N. as nitrate per 100 gms. of soil. To do this chemically pure sodium nitrate was added. Analyses made at the beginning showed that about 40 mgs. of N. as nitrate was present in the soil. The results of this experiment are grouped together in Table 8.

By studying the columns under this table it will be seen that the first nitrate analyses disagree more than later ones do. This was more than probably due to improper mixing of the nitrate salt with the soil. In almost every case, except that of the Albemarle soil, during the course of the year there is a very slight increase of nitrate nitrogen in the protected series. This increase is not nearly so great as that of the untreated soil, unless we assume that part of the N. of the nitrate radicle is converted into some other form. It may be that very little nitrification goes on when nitrates are present in such large quantities.

Total nitrogen analyses at the end of this experiment show that (see tables 9—13) the nitrogen content of the soil has not changed, even after one year. No nitrate reduction has gone on during this period. The same amount of nitrate was found at the end as at the beginning. This shows that under ordinary conditions, with a water content of one-half saturation capacity, nitrates do not undergo a rapid change. In other words, with this water content no denitrification was observed.

---

[1]) Koch u. Pettit, Loc. cit.

Table 8. The Nitrate Holding Power of Various Types of Virginia Soil. Protected and unprotected.

Time of Analyses	Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. of Dry Soil									
	Albemarle		Appo. Choc.		Appo. Light		Blacksburg		Norfolk	
	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors	Green house	Out-doors
Nov. 6, 1911	43.0	43.0	39.9	39.9	39.0	39.0	39.6	39.6	41.7	41.7
Dec. 6, 1911	41.3	—	40.2	—	39.8	—	41.0	—	42.0	—
Jan. 20, 1912	41.0	11.5	40.0	1.36	40.0	12.2	39.0	24.5	—	18.2
March 6, 1912	41.5	—	41.0	—	38.7	—	40.0	—	—	—
Apr. 6, 1912	42.0	2.67	40.5	6.1	—	3.0	—	5.7	42.0	2.8
May 20, 1912	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
July 6, 1912	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sept. 6, 1912	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nov. 6, 1912	42.8	0.99	41.7	0.86	41.6	0.76	42.6	0.80	44.8	0.95

A like series exposed to the heavy winter rains gave quite different results. After two months one-half to one-third of the original nitrate content was leached out and by the end of the fifth month nearly all of the nitrate is lost.

The general conclusions that may be drawn from this experiment are:

1. Applications of sodium nitrate to soils in pots protected from leaching, where the moisture content is kept fairly constant, will remain for a long time without undergoing any great change as regards amount of nitrate nitrogen.

2. When added to soils outdoors the opposite is true. In a very short time the nitrate is washed out.

Summary.

All of the soil types tested show a marked nitrate accumulating power when protected. This gain is greater with certain soils than with others. The per cent of the total nitrogen converted into nitrates is unusually high.

2. The rate of nitrification as measured by the conversion of ammonium sulphate into nitrate is different in the various types of soil. Here Appomattox Chocolate is first and in the descending scale, Norfolk, Blacksburg, Albemarle and Appomattox Light.

3. Dilutions with sand increases the rate of nitrate formation in the two types of clay soil used in this experiment.

4. Applications of lime cause an enormous increase in the rate of nitrification. The total amount of nitrate formed during one year in these soils treated with lime is more than is possible from the ammonium sulphate alone.

5. When nitrates are added in large quantities as sodium nitrate to protected soils there is almost no loss from denitrification, provided the moisture content does not exceed one-half total saturation capacity.

Analytical Data.

This includes tables 9 and 13. It gives in full all of the analyses on which the results of the previous work is based. Because of the similarity of these various tables it is not necessary to give a very careful description of each one. The data contained in these tables represents the complete analyses of all soil types from the beginning to the end of the experiment. For each soil type two tables are given, the first one representing Series I pots in greenhouse; Series II, pots outdoors.

Table 9. The Formation of Nitrates in Albemarle Soil.

Series I. Greenhouse.

Milligrams of N. per 100 gms. of Dry Soil			Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. Dry Soil								
At End	At Beginning	Gain or Loss	Nov. 6 1911	Dec. 6 1911	Jan. 20 1912	Mch. 6 1912	Apr. 6 1912	May 20 1912	July 6 1912	Sept. 6 1912	Nov. 6 1912
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
Albemarle Unfertilized											
110.5	110	+0.5	0.78	—	—	—	4.6	6.5	6.8	8.5	9.4
Albemarle plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
146.0	145	+1.0	0.78	1.9	4.0	11.7	16.5	23.6	23.0	25.0	25.7
Albemarle plus 0.2% Ammonium Sulphate plus 25% Sand.											
120.7	124.3	—3.6	0.56	2.0	4.1	9.7	16.3	19.1	25.3	27.8	28.4
Albemarle plus 0.2% Ammonium Sulphate plus 0.1% Lime.											
145.6	145	+0.6	0.78	2.4	18.0	23.7	—	39.0	39.5	40.5	40.5
Albemarle plus 0.26% Sodium Nitrate.											
152.0	150	+2.0	43.0	41.3	41:0	41.6	42.0	—	—	—	42.8
Series II. Outdoors.											
Albemarle unfertilized.											
108.3	110	—1.7	0.78	—	—	—	2.6	3.7	3.0	3.0	0.85
Albemarle plus 0.2% of Ammonium Sulphate.											
109.3	145	—35.7	0.78	—	0.99	—	5.2	9.3	5.3	3.5	1.3
Albemarle plus 0.26% of Sodium Nitrate.											
108.5	150	—41.5	43.0	—	11.5	—	2.67	—	—	—	1.0

By reviewing the tables it will be noted that the first three columns, a, b and c give the total nitrogen analyses at beginning and at end.

In Series I, with all soil types, there is little if any change in the nitrogen content of these soils. Some show a slight gain while others show a slight loss; in each case, however, the amount gained or lost is entirely within the error of analysis.

With Series II, quite the opposite is true; the heavy rains and snows leached out all of the added nitrate and ammoniacal nitrogen, so that by the end of the year the total nitrogen analyses did not show any more nitrogen than the unfertilized controls. See columns a, b and c. Series II.

Table 10. The Formation of Nitrates in Appomattox Chocolate Soil.
Series I. Greenhouse.

Milligrams of N. in 100 gms. of Dry Soil			Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. Dry Soil								
At End	At Beginning	Gain or Loss	Nov. 6 1911	Dec. 6 1911	Jan. 20 1912	Mch. 6 1912	Apr. 6 1912	May 20 1912	July 6 1912	Sept. 6 1912	Nov. 6 1912
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
Appomattox Chocolate unfertilized.											
105.2	104.1	+1.1	1.02	—	—	—	7.8	9.8	9.2	10.2	10.7
Appomattox Chocolate plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
137.0	139.0	—2.0	1.02	9.1	12.3	30.1	30.5	31.2	31.7	34.7	34.2
Appomattox Chocolate plus 0.2% Ammonium Sulphate plus 25% Sand.											
115.0	113.0	+2.0	0.85	6.65	9.8	28.9	31.3	38.7	38.0	38.1	38.9
Appomattox Chocolate plus 0.2% Ammonium Sulphate plus 0.1% Lime.											
138.8	138.5	+0,3	1.0	11.5	26.3	37.3	38.2	40.7	42.0	43.4	43.8
Appomattox Chocolate plus 0.26% Sodium Nitrate.											
145.0	144.0	+1.0	39.9	40.2	40.0	41.0	—	—	—	—	41.2
Series II. Outdoors.											
Appomattox Chocolate unfertilized.											
104.3	104.1	—0.2	1.02	—	—	—	4.3	3.4	4.1	4.5	0.82
Appomattox Chocolate plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
105.0	139.0	—34.0	1.02	—	2.4	—	9.1	9.0	6.3	6.2	1.02
Appomattox Chocolate plus 0.26% Sodium Nitrate.											
103.6	144.0	—40.4	39.9	—	13.6	—	6.1	—	—	—	0.86

Table 11. The Formation of Nitrate in Appomattox Light Soil.
Series I. Greenhouse.

Milligrams of N. in 100 gms. of Dry Soil			Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. of Dry Soil								
At End	At Beginning	Gain or Loss	Nov. 6 1911	Dec. 6 1911	Jan. 20 1912	Mch. 6 1912	Apr. 6 1912	May 20 1912	July 6 1912	Sept. 6 1912	Nov. 6 1912
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
Appomattox Light Unfertilized											
62.0	60.5	+1.5	0.45	—	—	—	5.5	5.9	6.2	6.1	6.5
Appomattox Light plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
93.0	95.5	—2.5	0.45	1.05	2.4	3.8	13.2	15.6	17.7	22.2	29.2
Appomattox Light plus 0.26% Sodium Nitrate.											
100.1	100.5	—0.4	39.0	39.8	40.0	38.7	—	—	—	—	41.6
Series II. Outdoors.											
Appomattox Light Unfertilized.											
63.4	60.5	+2.9	0.45	—	—	—	3.7	3.0	3.8	3.0	0.76
Appomattox Light plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
62.8	95.5	—32.7	0.45	—	0.91	—	3.0	5.6	6.16	3.96	0.85
Appomattox Light plus 0.26% Sodium Nitrate.											
62.4	100.5	—38.1	39.0	—	12.2	—	3.0	—	—	—	0.76

Table 12. The Formation of Nitrates in Blacksburg Soil.

Series I. Greenhouse.

Milligrams of N. in 100 gms. of Dry Soil			Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. Dry Soil								
At End	At Beginning	Gain or Loss	Nov. 6 1911	Dec. 6 1911	Jan. 20 1912	Mch. 6 1912	Apr. 6 1912	May 20 1912	July 6 1912	Sept. 6 1912	Nov. 6 1912
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
Blacksburg Unfertilized.											
96.4	94.0	+2.4	0.7	—	—	—	5.6	6.3	6.3	5.8	6.7
Blacksburg plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
129.3	129.0	+0.3	0.7	4.7	6.85	16.4	25.2	—	26.8	29.7	35.1
Blacksburg plus 0.26% Sodium Nitrate.											
132.0	134.0	—2.0	39.6	41.0	39.0	40.0	—	—	—	—	42.6
Series II. Outdoors. Blacksburg Unfertilized.											
94.1	94.0	+0.1	0.7	—	—	—	3.6	3.3	4.2	3.1	1.1
Blacksburg plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
94.7	129.0	—34.3	0.7	—	1.8	—	5.3	7.2	6.9	5.7	1.2
Blacksburg plus 0.26% Sodium Nitrate.											
94.8	134.0	—39.2	39.6	—	24.5	—	5.7	—	—	—	0.80

Table 13. The Formation of Nitrates in Norfolk Soil.

Series I. Greenhouse.

Milligrams of N. in 100 gms. of Dry Soil			Milligrams of N. as Nitrate per 100 gms. Dry Soil								
At End	At Beginning	Gain or Loss	Nov. 6 1911	Dec. 6 1911	Jan. 20 1912	Mch. 6 1912	Apr. 6 1912	May 20 1912	July 6 1912	Sept. 6 1912	Nov. 6 1912
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
Norfolk Unfertilized.											
104.1	102.6	+1.5	2.1	—	—	—	9.2	9.7	10.1	9.1	9.0
Norfolk plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
138.0	137.6	+0.4	2.1	5.5	8.3	24.2	31.7	33.8	33.5	33.6	34.5
Norfolk plus 0.26% Sodium Nitrate.											
140.4	142.6	—2.2	41.7	—	—	42.0	—	—	—	—	44.8
Series II. Outdoors. Norfolk Unfertilized.											
101.6	102.6	—1.0	2.1	—	—	—	3.9	3.1	0.99	2.34	0.90
Norfolk plus 0.2% Ammonium Sulphate.											
101.7	137.6	—35.9	2.1	—	1.64	—	5.1	5.0	1.34	2.37	0.95
Norfolk plus 0.26% Sodium Nitrate.											
100.4	142.6	—42.2	41.7	—	18.2	—	2.8	—	—		0.95

In columns d to l, Series I and II, the periodic nitrate analyses are given. With Series I there is a gradual increase in nitrate in pots 1 and 2 throughout the entire year. Where lime or sand is added, as in Albemarle and Appomattox Chocolate soil, this rate of nitrification becomes much more rapid and the amount of nitrate formed is greater. See column 1. The pots to which nitrates were added do not show any loss in this substance.

In Series II the netrate formation is quite different. Pot number 2 has an amount of nitrate slightly greater than the controls. By the end of summer, however, this difference is not marked. Where nitrate was added there was very little found after the first two months.

Nachdruck verboten.

The Occurrence of Saccharomyces Zopfii in Cane Syrups and Variation in its Resistance to high Temperatures when grown in Solutions of varying Densities.

By **W. L. Owen,**
Research Bacteriologist of The Louisiana Sugar Experiment Station, Audubon Park, New Orleans.

With 5 Figures.

The fermentation of canned cane syrup is a source of great loss to manufacturers of this material in almost all parts of the country. So much attention is paid by the buyers of these syrups to the appearance of the can, that even where the contents are not materially changed in their composition the goods are promptly rejected if there be the slightest evidence that the damage to the can is the result of fermentation. In Louisiana the manufacturers of high grade syrups experience great loss from the rejection by their customers of large quantities of these canned goods which show signs of fermentation. These returned goods show signs of varying grades of deterioration. In some cases the cans are completely bursted from the pressure of the gas formed during fermentation; while others show a slight puffing of the tops, which is sufficient basis for their rejection by the buyer.

Many samples of these „puffed goods“ were recently submitted to the writer for investigation as to the causative factor in their decomposition. The cans received for investigation contained various grades of syrups and molasses which appeared in varying stages of fermentation. A microscopical examination of these samples showed, in most cases, the presence of both yeast and bacteria cells, the latter often predominating. The yeast cells were at first regarded as purely adventitious in their relation to the decomposition. The syrups in their composition, as well as their method of treatment, would naturally throw suspicion upon the bacteria in the can, rather than upon the yeast. The usual cane syrup for table use has a density of between 70—75 Brix, which would ordinarily be considered unfavorable both for bacteria and yeast. In addition to the high density of these products, moreover, the temperatures to which they are subjected would ordinarily be expected to preclude the survival of any yeast cells, and only spores of bacteria or certain thermophilic species, would be expected to survive it. The temperature at which the syrups are sealed up in the can is usually about 78° C., and the density of the syrup is so high that this temperature is usually maintained for a considerable period owing to the slowness with which the syrup cools. Under these conditions it was not expected that the yeast cells found in the puffed cans were the causative factor in this fermentation. So the investigation was directed towards the isolation of the bacterial species, or a group of such species, which could induce the characteristic fermentation. With this in view, samples of syrups were plated out on molasses agar, synthetic agar, and also on peptone agar media. The species developing on these plates were each tried in turn on sterilized syrups. These inoculated syrup tubes were then incubated for several weeks, and although a slow development took place, in no case could any marked fermentation be observed. It was next thought that the failure to isolate the causative agent was due to the fact that it was an anaerobic species that could not develop under the aerobic conditions which were maintained in the cultural methods employed. Anaerobic cultures were next made, the anaerobic conditions being obtained by the hydrogen displacement method with special culture plates. Several anaerobic cultures were isolated by this means, each of which was tried in sterilized syrups of a similar composition to that in which they were found to occur. The tube containing the sterile syrup was inoculated with a platinum loop of the culture and the surface of the syrup covered with melted paraffin, forming a layer about one inch in thickness. It was thought that this treatment would furnish the desired conditions for anaerobic development in view of the fact that the syrup itself was of such high density that it would not readily admit access of air below the surface. These methods, however, proved of no greater value than the others which had been employed in isolating the causative agent in the fermentation of the syrups. In no case was there any gas development that could be regarded of equal intensity to that which takes place in the fermenting cans. Efforts to isolate a bacterium that caused fermentation having failed, our attention was next directed to the yeast cells which had been frequently observed in the „puffed goods" investigated. A sample of one of these fermented syrups which had been found to contain an unusually large number of yeast cells, was taken and used as inoculating material for the treatment of other syrups. In every case where sterile syrup was inoculated from a sample of fermented syrup, containing these yeast cells, an active fermentation invariably resulted, which was characterized by an intense gas development and by a corresponding development of the yeast cells originally introduced. These cells were characteristically small, having a maximum diameter of only about four microns. The isolation of this yeast, however, did not prove the simple undertaking that it appeared. The use of ordinary laboratory culture media, as for example, sucrose, glucose and syrup agars, failed to produce any development of yeast colonies, although in all cases some bacterial development took place. The syrup agar which had been used successfully in the laboratory in the cultivation of various species of molasses yeast, failed repeatedly when used for this particular species. This syrup agar commonly employed in the laboratory was simply dilute syrup of approximately 11 Brix, to which 0.5 per cent of peptone was added, and 2 per cent of agar. The repeated failure to isolate the yeast by ordinary means suggested the possibility of its possessing very unusual culture requirements. The fact that it would not grow on a culture media whose basis was the same material as that in which it occurs, naturally indicated that the deficiency in the culture medium was a physical rather than a chemical one. The dilution of a syrup from 70 to 11 Brix should have furnished a medium which contained sufficient sugars and salts and the addition of peptone should have corrected any deficiency in the nitrogen requirement if the latter occurred in amounts less than that demanded by the yeast. The sudden change, however, from a solution so dense as that of a syrup of 70 Brix to one of slightly over 11 might readily be supposed to influence the yeast cells unfavorably. It is a wellknown fact that this sudden change of density of solution may easily induce plasmolytic action upon the cells, and unless these cells can acclimatize themselves to this change this injury may induce their death. This fact suggested that the failure of the yeast to grow in the syrup agar was due to the effect of this sudden change in density from the original high density syrup to the thin syrup agar. To correct this defect the original syrup of 71.5 Brix was taken and 2 per cent of agar added to it. This syrup agar was then sterilized in the usual way in a sterilizer. Plates were then made, using a badly fermented syrup as inoculating material. The plates were then set aside in an incubator and kept at a temperature of about 30° C for several days. At the end of this time the surface of the plates were found to be covered with grayish, round elevated colonies of about the size of a pin head in diameter. Under the microscope these colonies were found to be composed of the small elliptical yeast cells observed in the fermenting syrup. The yeast was found to be a true saccharomyces forming ascospores, and was identified as Saccharomyces Zopfii, which had been completely studied by Artari[1]). This yeast was isolated from a beet juice in a sugar factory in Saxony, where it had been found associated with Leuconostoc mesenterioides. From the pure culture obtained by the use of thick syrup agar a sterile syrup of density 71.5 Brix was inoculated. These inoculated tubes fermented promptly and vigorously, giving off large quantities of gas that indicated that in this species of yeast we have probably the cause of the "puffing" of canned syrups. In order, however, to prove conclusively that this species was the causative factor in this fermentation, and that it was capable of furnishing sufficient gas to induce the characteristic bursting of the cans, special inoculation experiments had to be conducted. With this end in view, four cans of apparently sound syrup were secured from a local syrup factory for inoculation purposes. Two of these cans were inoculated with one cc of a pure culture of Saccharomyces Zopfii grown in syrup. The inoculation was made by punching small holes through the top of the can and introducing the inoculating material with a sterile pipette. After inoculation the holes were hermetically sealed with tin solder and the cans were placed in the incubator. The other two uninoculated cans were kept in an incubator as controls in order to test their soundness and to prove whether the fermentation following the inoculation could be attributed to the inoculating material used. After three days one of the inoculated samples had already shown signs of fermentation, the top of the can having bulged considerably. At the end of a week both of the inoculated cans had "puffed" so badly that it was thought best to remove them from the incubator for fear of their bursting. At the expiration of two weeks one of these cans had bursted around the seams from which the contents were slowly escaping. Neither control showed any sign of fermentation either from the outer appearance of the can or from an examination of their contents (Illustration 1).

---

[1]) Über einen im Safte der Zuckerfabriken in Gemeinschaft mit Leuconostoc schädlich auftretenden, den Zucker zu Alkohol und Säure vergärenden Saccharomyces. (Abhandl. d. Naturforsch. Gesellsch. Halle. 1897. Bd. 2.)

These and similar experiments showed conclusively that Saccharomyces Zopfii which had been isolated from syrup could induce a "puffing" of the cans similar the that which occurs so frequently under natural

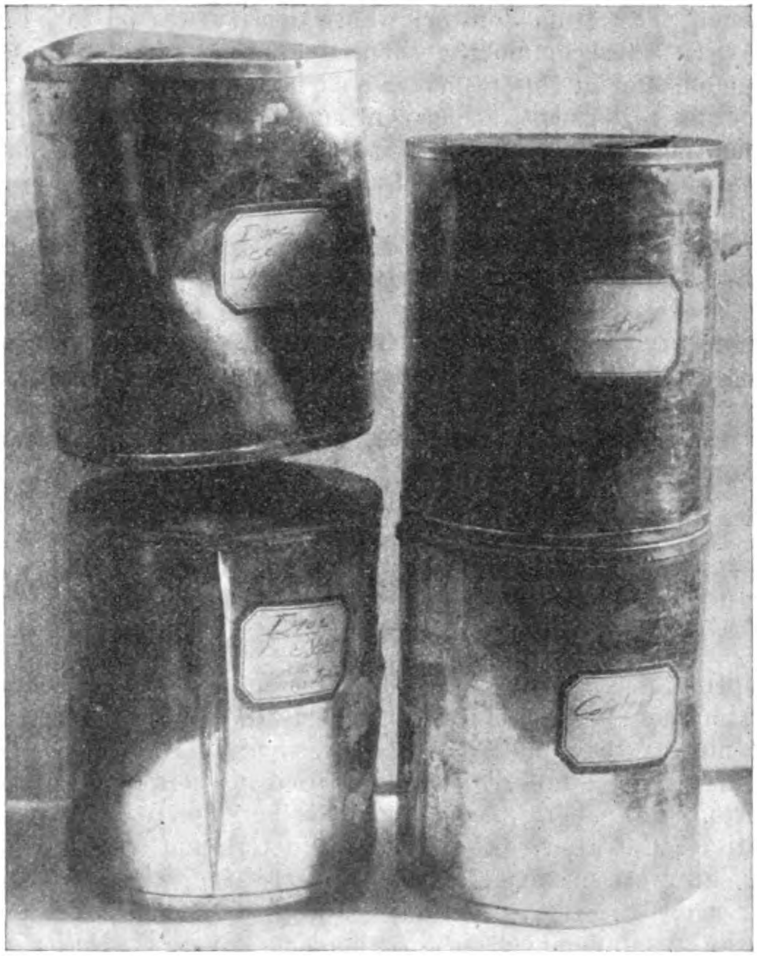


Fig. 1. Showing effects of Inoculation of Canned Syrup with Saccharomyces Zopfii.

conditions. Two of the most prominent characteristics of the Saccharomyces Zopfii, as shownin Artari's extensive investigations, are, its ability to ferment highly concentrated sugar solutions, and its resistance to heat. Artari found that this yeast could induce a vigorous fermentation with a 50 per cent solution of cane sugar, and was fairly active in concentrations as high as 60 per cent. While the ability to ferment such highly concentrated solutions of sugar may be regarded as unusual, it is a property which has been found to apply to other species of yeast. While the limits of concentration of ordinary yeasts are far within that at which Saccharomyces Zopfii is still active, there are other species which have been found to ferment such concentrated solutions. E. Dubourg[1]) found yeast in a sweet Sauterne wine which was still active at a concentration of 80 per cent invert sugar. Em. Laurent[2]) experimented with a series of beer and wine yeasts upon varying concentrations of sugar, and found developments at no higher concentrations than 60 per cent solutions of sucrose, dextrose and maltose. Ad. Mayer[3]) found that the concentrations at which yeasts were active could be heightened by the addition of one per cent of Rochelle salts by which the plasmolytic action was lessened. P. Lindner[4]) isolated new species of yeast from Jopwort whose density was 53 to 54 Brix. The ability of yeast to accommodate themselves to high densities, however, is not common, and in this respect Saccharomyces Zopfii, which Artari found to ferment 50 per cent sugar solution and which the writer found fermenting a cane syrup of 71.5 Brix containing approximately 60 per cent of total sugars may be regarded as unusual.

The other unusual characteristic of the Saccharomyces Zopfii, as shown in Artari's investigation, is its resistance to high temperatures. In his experiments he found the thermal death point of this yeast to be about 67° C. This resistance is very much higher than that of most species of yeast, and in fact is equivalent to that of many non-spore bearing bacteria. In comparison, the resistance of various yeasts to heat, as shown by Artari, is as follows:

Saccharomyces cerevisiae	is killed by moist heat	between	52—53
„ ellipsoideus	is killed by moist heat	between	54—56
„ Zopfii	is „	at	67° C
Leuconostoc mesenterioides	is killed	„	87—88
Bacterium vernicosum (Zopf)	„ „	„	73—75
By Dry Heat.			
Leuconostoc mesenterioides		„	100—114
Bacterium vernicosum (Zopf)		„	115—120
Saccharomyces Zopfii		„	130—135.

The optimum temperature for the development of this species is 28 to 29; its maximum 40 to 43, and its minimum 11 to 14. Regarding the influence of high temperatures upon yeast, Hansen[5]) showed that both spores and vegetative cells of different species varied in their resistance to elevated temperatures. The spores were found to be slightly more resistant than the vegetative cells. He also found in these determinations that the condition of the cell had great influence upon their resistance, which depended largely upon their age.

Thus the two-day old cells of Saccharomyces ellipsoideus II were grown in wort at 27° C and killed on being exposed to 56° for 5 minutes; while the two-month old cells could be heated to 60° for 5 minutes without being killed. The ripe spores in these species withstood heating for 5 minutes at 62°, but not at 66°. Kayser[6]) found that yeast cells withstood much higher temperature when in a dry than when in a moist condition. In one case he found by experiment that a certain species of yeast which was killed at a temperature of 60 to 65 degrees when in a moist condition, withstood a temperature when dry of 105 to 110 degrees. The resistance of the spores was 10 to 20 degrees higher than that of the vegetative cells. Henneberg, W.[1]) found that various races of yeast differed considerably in their resistance to heat. Saaz yeast ceased to bud at from 50 to 52 degrees, Frohberg yeast at 54 to 56, and Race XII at 58. The cells stained, according to the staining agent employed, as follows: Saaz at 58 to 60, Frohberg at 64, Race XII at 68 and Race II at 68 to 70. Schoenfeld and Rommel, W.[2]) showed that a certain yeast that had been grown for a long time in association with lactic acid bacteria possessed an unusually high resistance to heat. The resistance of this yeast was so high that it many times survived a temperature which killed lactic acid bacteria with which it was infected. It was found that the yeast could withstand a temperature of 65 degrees for 30 minutes, and that the budding cells were more resistant than the old cells. The yeast, however, was greatly weakened both in its developing and fermenting power at elevated temperatures. The ability of Saccharomyces Zopfii to withstand a temperature of 67 degrees C as shown by Artari, does not explain its presence in a living condition, in cans of syrup which are hermetically sealed from air and heated at a temperature of about 78 degrees. As this temperature is constantly maintained in the factory where the syrup samples were taken, it would have been necessary for the yeast to have withstood a considerably higher temperature than 67 degrees to have been able to survive the treatment that these products received. Evidently the yeast associated with the fermentation of the canned syrups has a higher thermal death point than that shown in Artari's experiments. In order to prove that Saccharomyces Zopfii isolated from a can of fermented syrup could withstand a temperature of 78° C when grown in a syrup similar in composition to that in which they had induced the fermentation, the following experiment was conducted. The original syrup was taken as a basis for the preparation of the following four series of nutrient solution: A. Original syrup untreated; B. Original syrup, 2 parts, plus 1 part of Artari's solution, which has the following composition:

---

[1]) Rev. de Viticult. 1897. p. 467.
[2]) Ann. Inst. Pasteur. T. 28. 1888. p. 603.
[3]) Ber. d. Deutsch. Chem. Gesellsch. Bd. 13. 1880. p. 1163.
[4]) Wochenschr. f. Brauer. Bd. 10. 1893. p. 153.
[5]) Allgem. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. 1883.
[6]) Ann. Inst. Pasteur. T. 3. 1889.

Na_2HPO_4	0.15 %
$MgSO_4$	0.10 %
$(NH_4)_2SO_4$	0.15 %
Grape sugar	2.00 %

C. original syrup and Artari's solution equal parts; D. one part of syrup plus two parts of solution. It was thought, since Artari's experiments were conducted in solutions of low density, that the behavior of the yeast might be different in solutions of higher density than that which he had employed. Artari called attention to the fact that the size of the cells varied considerably in solutions containing various amounts of different salts, and also in different concentrations of the same salts. It has been observed in our experiments that there is a considerable variation in the size of the yeast cells when occurring in syrup solutions of various densities. For example the dimensions of the cells when grown in the original syrup and in Series D., are shown in the following table:

Series	Density Brix	Diam. μ	Length μ
A	71.1	3.80	7.20
D	31.49	4.43	7.43

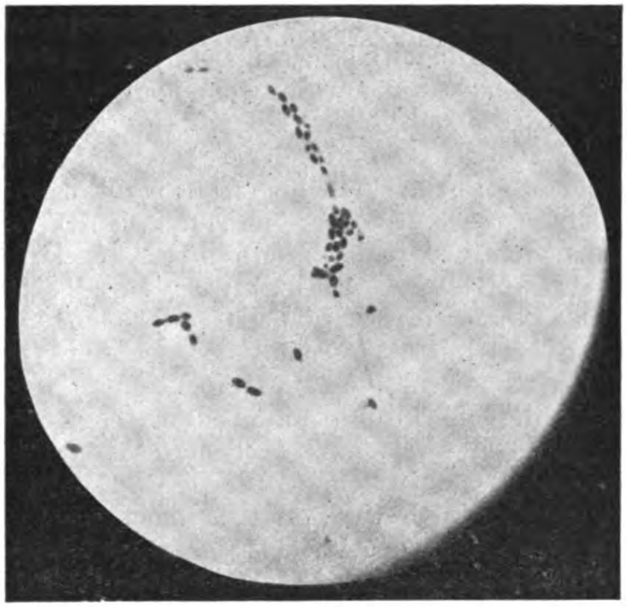
Artari found that the average diameter of Saccharomyces

---

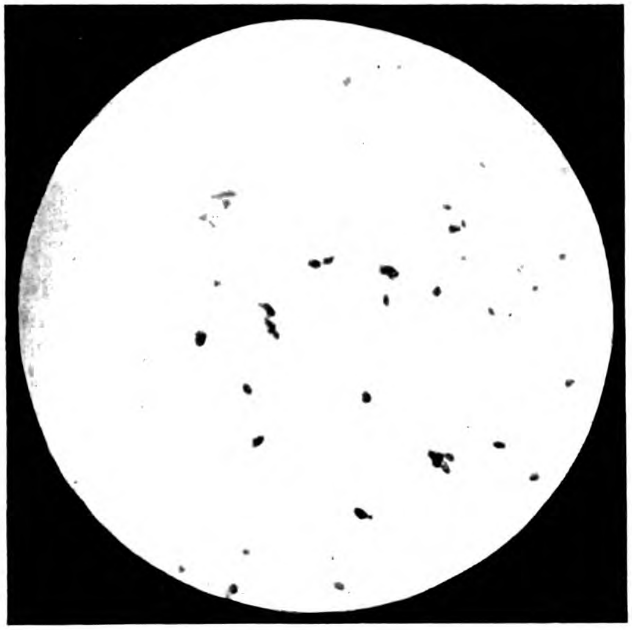
[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 97.

[2]) Wochenschr. f. Brauer. Bd. 26. p. 327.

Zopfii was only from 3 to 6 microns under ordinary conditions, but that this could be increased, by the addition of certain salts, to 8 microns. Kossowicz[1]) found that the size of yeast cells could be increased by the addition of magnesium sulphate, and also by potassium chloride when used up to 12 per cent. Laurent, E. M.[2]) made similar observations with the use of KNO_3 up to 30 per cent. That an increased resistance to heat might be associated in this case with the decrease in size of the yeast cells when grown in dense solutions, was regarded as a possible explanation of the occurrence of this yeast in cane syrup which had been heated to 78° C. Although in the present stage of the development of our knowledge of microorganisms, no such relationship between variation in size of cells and their resistance to heat has been established, yet it does not seem inconceivable that such a relation might exist. Where the size of cells are materially decreased by virtue of the density of the solution in which they are grown, it seems probable that the density of the interior of the cells being greater that they would be more resistant to heat than would otherwise be the case. That there should be a relation between the density of the contents of the cells and their resistance to heat seems more probable when we consider the fact that the probable resistance of spores of bacteria to high temperatures may be attributed to the exceedingly dense nature of their protoplasmic



A. S. Z. in Series A. Magnified × 400.



B. S. Z. in Series B. Magnified × 400.

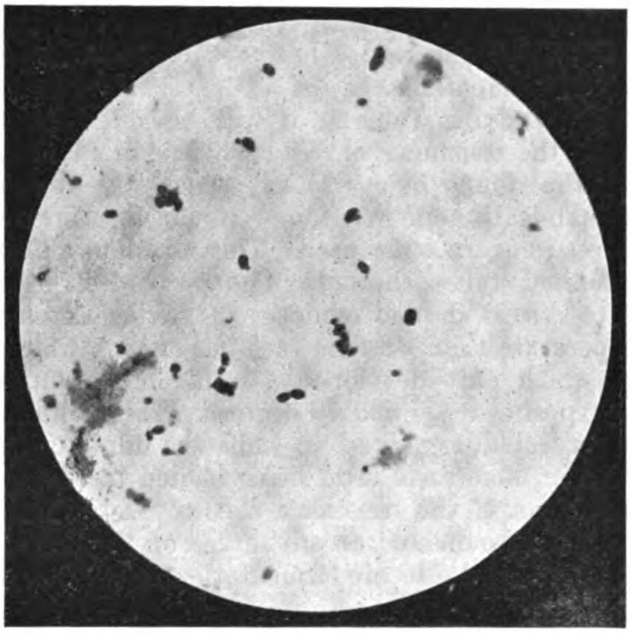
---

[1]) Zeitschr. f. d. Landw. Versuchswes. Österr. Bd. 6. 1903. p. 27.
[2]) Ann. Soc. belge d. Microsc. T. 14. 1890. p. 29.

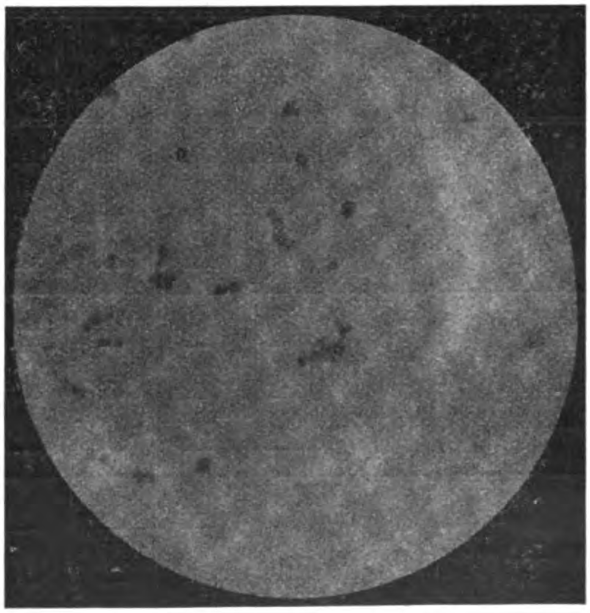
Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

contents. In the case of bacterial spores we are dealing with cells whose contents represent the contraction into a very small area of the contents of a much larger cell.

The four series of syrups A. B. C. D. were poured into tubes, about 10 cc to each tubes, plugged with cotton and thoroughly sterilized intermittently for 15 minutes for three successive days. One tube from each series was inoculated with a pure culture of Saccharomyces Zopfii, and then placed in the incubator where it was allowed to develop. After development had taken place in each of the tubes, which usually occurred in two or three days, one cc portions were transferred from each tube to four sterile tubes of the same size. Inoculations were made from cultures of the same composition, because it was thought advisable to have the transfers made under as nearly equal conditions as possible. By inoculating the tubes from cultures in solutions of higher or lower density it might be supposed that certain changes in the osmotic pressure might tend to vitiate the results. Immediately after the inoculation the tubes were placed in a water bath and brought to the desired temperature. Five minutes was allowed for the water bath to reach the required temperature, and an additional 5 minutes for the contents of the tube to reach this temperature, which was determined by means of a thermometer inserted in an extra tube used for this purpose. In every series control tubes were inoculated and placed in the incubator without heating, in order to determine the retarding influence of the heating in every case. After heating, the tu-



C. S. Z. in Series C. × 400.



D. S. Z. in Series D. × 400.

bes were immediately placed in a bath of cold water to cool them down as rapidly as possible. By cooling them in this way the greater retention of heat by the thick syrup would be to a certain extent offset. Otherwise the tubes of undiluted syrup, retaining the heat, as they would do, more persistently than the thin syrup, would result in an actual difference of exposures to temperature in the tubes, and hence the result would not be entirely comparable.

In studying Table I, it will be noted that in all the dilutions employed the resistance of Saccharomyces Zopfii was much higher than that found by Artari, which was 67 degrees for five minutes. The thermal death point was found, in our experiments to be between 90 and 100 degrees in every series used. This was determined by the fermentation which inoculated tubes showed. Contrary to expectations, however, the more dilute syrups showed evidence of having sustained less injury at the lower temperature than was the case in Series A which contained undiluted syrup, and which only developed a feeble fermentation in two weeks even after the exposure to 60 and 70 degrees. The undiluted syrup never showed more than a feeble fermentation, while the diluted syrups showed marked fermentation in some cases after being heated to 80 degrees. On the other hand, a comparison of the resistance of the yeast when grown in the various series of solutions indicated an advantage on the part of the undiluted syrup, since they developed a feeble fermentation at 90° C at which temperature all of the

Table I.

Table Showing the Variations in the Effect upon Saccharomyces Zopfii of High Temperatures when grown in solutions of varying densities.

Series	No. of Tube	Thermal Death Point					Length of Exposure	Date of Inoculation
		60° C	70° C	80° C	90° C	100° C		
A Original Syrup	1	—	—	—	—	+	10′	5/22/13
	2	—	—	—	—	+	10′	„
	3	—	—	—	—	+	10′	„
B 2 parts syrup, 1 part Artari solution	1	—	—	—	—	+	10′	„
	2	—	—	—	—	+	10′	„
	3	—	—	—	—	+	10′	„
C Syrup, 1 part Artari solution	1	—	—	—	—	+	10′	„
	2	—	—	—	—	+	10′	„
	3	—	—	—	—	+	10′	„
D 1 part syrup, 2 parts Artari solution	1	—	—	—	—	+	10′	„
	2	—	—	—	—	+	10′	„
	3	—	—	—	—	+	10′	„

Table I.

Series	Time required for Fermentation Development					Density Degree Brix
	60° C	70° C	80° C	90° C	100° C	
A Original Syrup	f days 15	f days 15	f days 15	f days 15	—	71.1
	f 15	f 15	f 15	f 15	—	71.1
	f 15	f 15	f 15	f 15	—	71.1
B 2 parts syrup, 1 part Artari solution	v 7	v 11	a 15	—	—	56.28
	v 8	a 11	a 15	—	—	56.28
	v 11	a 11	a 15	—	—	56.28
C Syrup, 1 part Artari solution	v 40	v 40	t 30	—	—	41.5
	v 12	t 21	t 30	—	—	41.5
	v 50	t 21	t 30	—	—	41.5
D 1 part syrup. 2 parts Artari solution	v 20	v 30	—	—	—	31.49
	v 20	f 60	—	—	—	31.49
	v 20	f 60	—	—	—	31.49

v = vigorous
a = active
f = feeble
t = trace
} Degrees of fermentation.

other series remained entirely free from fermentative changes of any kind. From Series B through the entire series the resistance seemed to vary directly with the density of the solution. While B developed an active fermentation in two weeks after being exposed to 80° C., C required 30 days to develop even a trace, and D did not ferment at all at this temperature. Hence we have a cessation of fermentation in D between 70 and 80, and in B between 80 and 90, and in A between 90 and 100. This experiment shows conclusively that it may easily be possible for Saccharomyces Zopfii to withstand a temperature of 78° C to which the syrups are exposed under actual conditions in factories. In order, however, to prove this point more conclusively and to show that it was able to withstand the temperature under actual conditions in the factory, inoculating experiments were made in one of the large syrup factories in this vicinity. In these experiments about 1 cc of the solution containing a pure culture of the yeast was introduced into each of three cans directly after they had been filled with the hot syrup of the usual density. Immediately after the inoculation they were sealed in the ordinary way and set aside in the factory for observation. Uninoculated cans of the same grade of syrup were kept in the same condition. At the expiration of four months the inoculated cans were badly "puffed" from fermentation, while the controls showed no change whatever either in the appearance of the can or in the condition of their contents. This experiment in actual practice corroborates the evidence found in laboratory conditions as to the unusually high resistance of this yeast. While this ability of the Saccharomyces Zopfii to bring about a feeble fermentation of syrup after being exposed to high temperatures is apparent, yet it would not seem to explain certain cases of fermentation which sometimes occur in a very short time after the filling of the cans. From the experiments conducted in the factory where fermentation was noted only after four months, the possibility was suggested that cases where fermentation occurred at shorter periods of time would have to be explained in some other way. In this connection it was thought possible that through some overlooked condition in the syrup factory from which these samples were obtained, that yeast cells might be introduced into the cans without their being exposed to as high a temperature as was expected. It was thought that this might occur, for example, by using caps which having been exposed to the atmosphere of the room were contaminated with yeast cells. In this event these cells would not come into immediate contact with the hot syrup until after it is cooled down several degrees by the addition of cold water, which is sprayed upon the can immediately after the capping process. An examination of these caps was regarded as necessary for proof of the correctness of this suspicion. With this view caps were collected from the factory in the vicinity of the capping machines. These were collected with great care in order to avoid contamination, and were brought in envelopes to the laboratory for examination. They were then placed in sterile plates and sterile syrup was poured over them. After having been incubated for several days several of these plates showed signs of fermentation, and a microscopical examination of them showed the presence of Saccharomyces Zopfii in association with bacteria and various species of moulds. It is not improbable, therefore, that in many cases the fermentation of canned syrup by Saccharomyces Zopfii does not necessarily presuppose their having survived a temperature as high as 78° C. but, it seems probable that in such cases the syrups were infected from the caps, in which case the temperature might be reduced several degrees before coming in contact with the yeast cells. This would be a probable explanation of those cases where the syrups entered into vigorous fermentation after only a very short period of time elapses after the filling of the cans. In those cases where several weeks elapse before the cans show signs of "puffing" this might easily be attributed to the cell having resisted the temperature, and the tardiness of fermentation would be explained by the enfeebling action of the heat, as shown in our laboratory experiments to take place.

Since the indication of the various stages of fermentation in the different series employed does not necessarily give a true index of the number of cells surviving the heating process, it was thought advisable to supplement these observations with counting experiments. For this purpose counts were made of the number of yeast cells in the syrup by the Zeiss counting chamber, and also by the plate method with syrup agar used as a media. A comparison of the two methods, it was thought, might give some indication of the number of cells which had lost their power of development. The fact that the plate method might not admit of the development of all the surviving cells in the syrup, was realised but the method in this case is of importance in order to establish the fact as to whether the cells occurring in the syrups were capable of cell development. The medium employed for this work was a syrup agar, the original syrup being diluted with equal parts of water to which 2 per cent of agar was added. The dilutions employed were 1 to 500,000 in those cases which indicated marked development of yeast, and 1 to 1,000 in all other cases. The 1 to 500,000 dilution was made as follows: 1 cc of the syrup after having been thoroughly mixed, was introduced into a sterile pipette and introduced into a 200 cc flask of sterile water. From this solution 2 cc was again transferred to another flask of 200 cc capacity, making a dilution of 1 to 20,000, and 40 cc was then transferred to a one liter flask of sterile water from which 1 cc portions were used for the plates. The plates were then incubated at 30° C for one week. Counts of the colonies were made with the aid of a small magnifying glass.

Estimation of Yeast Cells in Syrups of various Densities exposed to various Temperatures.
Series A.
(Original Syrup, 71.1 Brix.)

Temp.	Tube No.	Estimated by Zeiss Counting Chamber	Estimated by Plates	Degree of Fermentation in Tube
I 60° C	1	880,000	10,000	Feeble
	2	1,000,000	14,000	F
	3	1,800,000	10,000	F
II 70° C	1	500,000	9,000	F
	2	600,000	7,000	F
	3	800,000	9,000	F
III 80° C	1	750,000	8,000	F
	2	600,000	8,000	F
	3	850,000	7,000	F
IV 90° C	1	880,000	8,000	F
	2	700,000	5,000	F
	3	750,000	6,500	F

Estimation of Yeast Cells in Syrups at various Densities exposed to various Temperatures.
Series B. (56.28 Brix.)
(2 Parts Syrup, 1 Part Artari's Solution.)

Temp.	Tube No.	Estimated by Zeiss Counting Chamber	Estimated by Plate	Degree of Fermentation in Tube
I 60° C	1	2,240,000	2,500,000	Vigorous
	2	1,700,000	1,850,000	Vigorous
	3	1,600,000	1,240,000	Vigorous
II 70° C	1	1,480,000	1,500,000	Vigorous
	2	1,920,000	1,000,000	Active
	3	1,428,000	1,000,000	Active
III 80° C	1	1,600,000	600,000	Active
	2	1,400,000	600,000	Active
	3	1,320,000	500,000	Active
IV 90° C	1	800,000	1,200	—
	2	1,240,000	15,000	—
	3	1,400,000	10,000	—

Estimation of Yeast Cells in Syrups of various Densities exposed to various Temperatures.
Series C. (41.5 Brix.)
(1 Part Syrup, 1 Part Artari's Solution.)

Temp.	Tube No.	Estimated by Zeiss Counting Chamber	Estimated by Plate	Degree of Fermentation in Syrup
I 60° C	1	2,800,000	270,000	Vigorous
	2	1,480,000	1,500,000	Vigorous
	3	2,400,000	2,225,000	Vigorous
II 70° C	1	2,400,000	2,000,000	Vigorous
	2	280,000	80,000	Trace
	3	420,000	210,000	Trace
III 80° C	1	920,000	130,000	Trace
	2	880,000	550,000	Trace
	3	1,000,000	600,000	Trace
IV 90° C	1	840,000	6,000	—
	2	920,000	5,000	—
	3	960,000	4,000	—

Estimation of Yeast Cells in Syrups of various Densities exposed to various Temperatures.
Series D. (31.49 Brix.)
(1 Part Syrup, 2 Parts Artari's Solution.)

Temp.	Tube No.	Estimated by Zeiss Counting Chamber	Estimated by Plate	Degree of Fermentation in Sample
I 60° C	1	2,400,000	2,220,000	Vigorous
	2	1,720,000	1,650,000	Vigorous
	3	2,320,000	2,000,000	Vigorous
II 70° C	1	2,880,000	2,555,000	Vigorous
	2	1,000,000	700,000	Feeble
	3	1,200,000	800,000	Feeble
III 80° C	1	880,000	28,000	—
	2	880,000	35,000	—
	3	900,000	30,000	—
IV 90° C	1	640,000	15,000	—
	2	600,000	9,000	—
	3	880,000	6,000	—

A comparison of the number of yeast cells in the various series show that the development in series A, the undiluted syrup, was less marked than in the diluted syrup exposed to the lower temperature, but that in spite of this retardation the feeble fermentation persisted throughout the higher temperatures, while in the other series no fermentation occurred in any case at a temperature beyond 80 degrees. In the diluted series the comparison between the microscopical count and the plate count indicated that no marked decrease took place in any case below 80 degrees, while in the original syrup such a decrease could be noted even at 60 degrees. From these results, which were several times repeated, it seems evident that high temperatures do affect Saccharomyces Zopfii differently in solutions of various densities. In high density solutions it seems that the lowered fermentation is effected at much lower temperatures than in lower density syrups, but that the enfeebled fermentation persists even at temperatures as high as 90° C. In series B, on the other hand, no traces of fermentation could be noted at 80, in spite of the fact that the transfers to plates showed the presence of living yeast cells.

In determining the limits of concentration of various salts which the yeast could withstand, Artari used the following compounds:

NaCl	from	0.5	to	15 %
$(NH_4)_2SO_4$	„	1.0	„	12 %
KH_2PO_4	„	0.5	„	8 %
$CaCl_2$	„	0.05	„	15 %

He found that the yeast is affected differently by different salts. While KH_2PO_4 is very injurious and stops fermentation at 3 per cent the yeast develops much better in solutions of the other salts where it takes place in 10 per cent solutions, and in 15 per cent solutions is still observable. It is interesting to compare the resistance of Saccharomyces Zopfii to a concentration of salts with yeast investigated by other authors. Swellengrebel[1]), who investigated pressed yeast, found that the limits of concentration of NaCl was from 0.275 to 0.28 molecules. Yabe, K.[2]) found a yeast in Sake that could withstand 6 per cent NaCl without having its fermentation power affected. Swellengrebel, however, found that by beginning with 0.5 molecules and increasing the concentration, that the yeast could be acclimatized to a 2.5 molecule solution, which was the maximum at which growth could be detected. This concentration, the author states, agrees fairly well with the observations of Wehmer[3]), who isolated a yeast from Herrings Lake, the salt content of which was 15 per cent, and found that this yeast could stand even higher concentration. In order to establish the limit of plasmolysis for Saccharomyces Zopfii in the sodium chloride solution, 20 and 30 per cent strength of this salt was used. The yeast was added to the solutions and left in contact with the salt for 24 hours. Not even in 30 per cent solutions were all the yeasts plasmolized, although some plasmolysis took place in 20 per cent solutions. According to De Vries[4]) theory of isotonic coefficients the osmotic action of sugar is equal to twothirds of NaCl, so that the yeast which seems not to be plasmolized in 60 per cent sugar solutions should be able to withstand 40 per cent solutions of sodium chloride. Evidently, the Saccharomyces Zopfii has an unusually high resistance to concentrated salt solutions.

Summary of Conclusions.

1. Saccharomyces Zopfii has been isolated from a large number of samples of fermenting cane syrup, and is believed to be the main factor in the prevalent decomposition which these products undergo.

2. Experimental evidence has been deduced which shows that the thermal death point of this yeast when grown in syrups both of high and low density, is far higher than that shown in Artari's experiments. Instead

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. p. 374.

[2]) Bull. Col. Agric. Tokio. Vol. 2. 1890. p. 219.

[3]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 3. 1897.

[4]) Jahrb. f. wiss. Botan. Bd. 14. p. 427, 601.

of 67° C., as shown by the author above referred to, we find this yeast capable of developing a feeble fermentation when heated 10 minutes at 90° C.

3. While the resistance of the yeast to high temperatures does not vary, as was first suspected, directly with the density of the solution in which it is grown, it does seem to retain its power of fermentation more persistently when subjected to such temperatures when grown in thick syrup, than when grown in more dilute solutions.

4. While temperatures under 70° C. do not seem to materially inhibit the fermentative power of the yeast when grown in dilute syrup, they have a marked inhibiting action upon it in very thick syrups.

5. That this enfeebled fermentative power which results from heating, is sufficient to produce the characteristic „puffing" of the cans is evidenced by the fact that cans which have been inoculated at the factory and subjected to the usual temperature of 78° C., have been „puffed" from fermentation in the course of from three to four months.

Nachdruck verboten.

The perennial Mycelium of Phytophthora infestans.

[Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture,
Washington, D. C.]

By **I. E. Melhus.**

Mit 2 Figuren im Text.

Considerable uncertainty and diversity of opinion exists in the literature as to how Phytophthora infestans propagates itself from one year to another. It has long been known that the members of the family to which Phytophthora belongs produce oospores which function in renewing infection. But whether this particular fungus produces oospores became the subject of controversy in the early seventies of the last century between W. G. Smith and De Bary. The outcome is too well known to need repetition, further than to say that De Bary's conclusion has been generally accepted. As early as 1861 and again in 1876 De Bary presented experimental evidence tending to show that the fungus, present in the diseased tubers, passed from one host generation to another in the mycelial stage. Since the first named date, attempts have been made to duplicate De Bary's experiments by Scholz, Brettschneider, Peters, Reess, Kühn, Jensen, Boehm, Smoranski, Hecke, Clinton, Massee, Pethybridge and Jones. No one has obtained confirmatory results except Jensen; and his evidence has failed to materially strengthen the perennial mycelium theory. As a result this capacity of the mycelium has been doubted and in many cases widely different hypotheses have been substituted. This is evident from the diversified statements in our text books.

In Tubuef and Smith[1]) "Diseases of Plants" we note this sentence: "It is generally assumed that the mycelium hibernates in the potato tubers from which the fungus recommences to spread in the spring."

In Rostrup's[2]) excellent text book of Plant Pathology we find the following discussion regarding the reoccurrence of the potato disease. The overwintering of Phytophthora infestans can hardly take place in other ways than by the aid of the living mycelium. One can imagine, however that a continous generation of sporangia and zoospores might be produced in mild, moist, storage where the mycelium is spreading from tuber to tuber. In general the disease has its origin in the field from one or more diseased tubers used for seed purposes. In such cases a part of the mycelium grows out into the under ground parts of the plant and another up through the stem to the surface of the soil.

In Sorauer's[3]) "Handbuch der Pflanzenkrankheiten" there occurs this sentence: Es unterliegt also keinem Zweifel daß das Mycel imstande ist aus der Knolle in die jungen Triebe hineinzuwachsen; indessen spielen hier doch gewisse äußere Verhältnisse mit, welche die Infektion erst ermöglichen." In Duggar's[4]) recent text book "Fungous Diseases of Plants" we find this statement: "An affected tuber which does not show the disease in severe form may be used for seed and thus the disease may be propagated from one year to another through the seed tubers." The most singular explanation is found in Massee's[5]) book entitled "Diseases of cultivated Plants and Trees." "The produce of a diseased tuber is always diseased, yet under certain conditions of weather the stem and leaves of the same plant may remain perfectly free from disease. This happens during bright, comparatively dry seasons, the mycelium in the tuber not being able to invade the above-ground portions. On the other hand, every practical potato grower knows too well that a few cloudy, damp and sultry days in July will start an epidemic of disease simultaneously over an entire field or over a whole district. The mycelium, favored by the weather conditions indicated above, takes possession of the stem and leaves, which succumb within a few days." Eriksson[6]) has very recently published a treatise on "Fungoid Diseases" in which occurs this interesting passage: "But, then, how does the disease first get into the leaves? This question is as yet unsolved, and so is also another query: In what way does the fungus of potato blight hibernate? Several different hypotheses have been brought forward, but none of them have been definitely proved. The only thing that we are sure of in regard to this fungus is, that it does not show a natural stage with resting spores as most of the other downy mildews do. At least, so far, all researches in the open for such a stage have proved futile." Clinton in one of his excellent papers on various phases of the morphology and control of late blight makes this statement: "We believe it comes by contact of the leaves with the ground at the critical wet periods of July and August when the germs of the blight are probably first generally available in the soil for infection, and that this is the usual method of primary infections in the fields."

---

[1]) p. 120.
[2]) p. 193.
[3]) p. 137.
[4]) p. 170.
[5]) p. 125.
[6]) p. 37.

In Pethybridge's report for 1912 we find this statement regarding the yearly reoccurrence of Phytophthora: "It appears to be practically certain that the primary attack of blight each season is due to spores, but where these spores come from is not known with certainty, and whether they are similar to those produced in such abundance on the potato foliage in warm, moist weather in the summer after the primary infection of the crop has taken place, or are of the nature of the thick-walled resting spores produced by species of Phytophthora allied to Phytophthora infestans, cannot be definitely stated at present."

It is not my object at this time to review the literature. I wish simply to show some of the noncommittal and diversified statements existing in the literature on this important phase of the life history of Phytophthora infestans. The recent interesting discovery by Jones and by Clinton that bodies resembling resting spores may be produced under certain conditions by this fungus has not strengthened the perennial mycelium theory. The direct bearing of this problem on the spread and control of the disease is perfectly obvious and makes it imperative that we study anew the possibility of the mycelium being able to transmit the disease directly. I have attacked the problem by first studying the spread of the mycelium into the sprouts when the tubers were subjected to favorable conditions for rapid growth and later the relation of the fungus to the shoots developing on diseased tubers planted in sterilized soil.

The diseased tubers used in studying this problem were harvested in the fall of 1911 at Madison, Wisconsin, from a plot badly attacked by late blight. Phytophthora has not been known to occur in the State of Wisconsin during the last ten years. The disease was started by infecting two plants in the plot during a wet period in September. Over 50 per cent of the crop was completely decayed at the time of digging. The rest were sorted and stored in a dry basement where the infected tubers began to germinate the last of December. At the time of planting many of the tubers had sprouts one-half inch long and in more cases the sprouts were fully one inch. On January 16 four boxes (18×18×6 inches) were filled half full of soil that had never grown a crop of potatoes and that had been steamed for 40 minutes in an autoclave at 15 pounds pressure. Twelve tubers were partially buried in each box, four of which were known to be sound and the remaining eight infected with Phytophthora. The diseased tubers showed the shrunken discolored areas so characteristic of Phytophthora dry rot. The soil was well moistened with distilled water and each box covered with a pane of glass. Each box of the series was held at a different temperature, as follows: 4° to 6°; 15° to 20°; 20° to 22°: and 23° to 27° C.

The tubers kept at 4° to 6° C, developed very slowly during the 39 days under observation and none of the sprouts became infected. The eight infected tubers subjected to 15° to 20° C. produced many sprouts, five of which became infected during the period under observation. The tubers subjected to 20° to 22° C. also produced five infected sprouts during the first fourteen days after planting. The greatest number of infections were obtained from the eight diseased tubers kept at 23° to 27° C. Thirteen sprouts became diseased during the first fourteen days after planting. The checks remained free from infection. Phytophthora seldom sporulated on the parent tuber unless the corky layer was broken, while it was a very common occurrence on the basal portion of the sprouts growing from infected tubers. In many

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

cases the eyes producing infected sprouts were cut out to learn whether the fungus was present in the tissues immediately surrounding them. In every case it was found to be present, which showed that the sprout infection might readily be due to the migration of the mycelium and not to spores present in the air. Had the infection been due to spores the checks should have shown as high a percentage of infection as the diseased tubers. Infection occurred on sprouts in all stages of development from those barely visible up to one inch in length. It was a very common occurrence to find the fungus fruiting first on the lower third of the sprout, while on the upper two-thirds it was not apparent, but it required only one or two days for the upper two-thirds also to become covered with the Phytophthora fruit. This data serves also as an index to the rate of spread of the mycelium in the tissues. Naturally discoloration and decay followed the fructification of the fungus. In Plate I, figure 1, is shown a potato with diseased and healthy sprouts. This is a late stage of sprout infection and the tissues of the two infected shoots have blackened. The healthy sprout stands on a portion of the tuber showing no external evidence of disease, while that part surrounding the decaying sprouts is infected by the fungus. The fungus sporulated only on the sprouts of the diseased tubers, while those arising from the healthy tubers in the same box remained sound throughout, which makes it certain that infection was not by spores present in the air or soil, but by the migration of the mycelium in the tissues of the parent tuber.

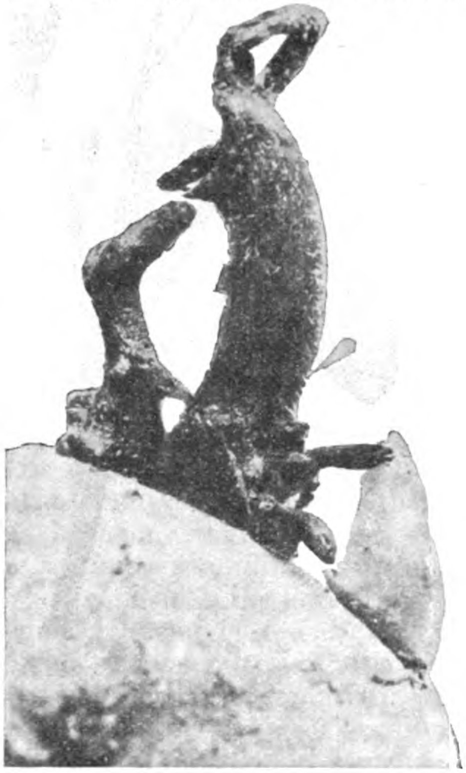


Fig. 1.

Having established the fact that the mycelium may readily spread from the tuber into the young sprouts, attempts were made to learn whether it would not also grow up into the taller shoots and stems. Practically the same method was used as in the study of sprout infection, except that the sound and diseased tubers were planted separately, and the boxes were each covered with a small glass house, 18 × 18 × 24 inches, when the plants began to come up. This was done in order to maintain a moist atmosphere, a very important requirement for the vigorous growth of Phytophthora.

On March 10, 1912, three boxes were prepared and planted with 24 Phytophthora-infected tubers. In three other boxes were planted 24 sound tubers as controls. Two of the boxes containing diseased tubers and two of the controls were placed in a greenhouse used for certain plant nutrition experiments where the temperature ranged from 23° to 27° C. and where there never had been any Phytophthora previously. The remaining two boxes one with healthy and the other with diseased tubers, were placed in a greenhouse where the temperature fluctuated, depending upon the time of day, from 15° to 20° C. In this case also there was no possibility of Phytophthora spores being present in the air as this house had never grown a crop of potatoes and at the present time it was growing a crop of lettuce.

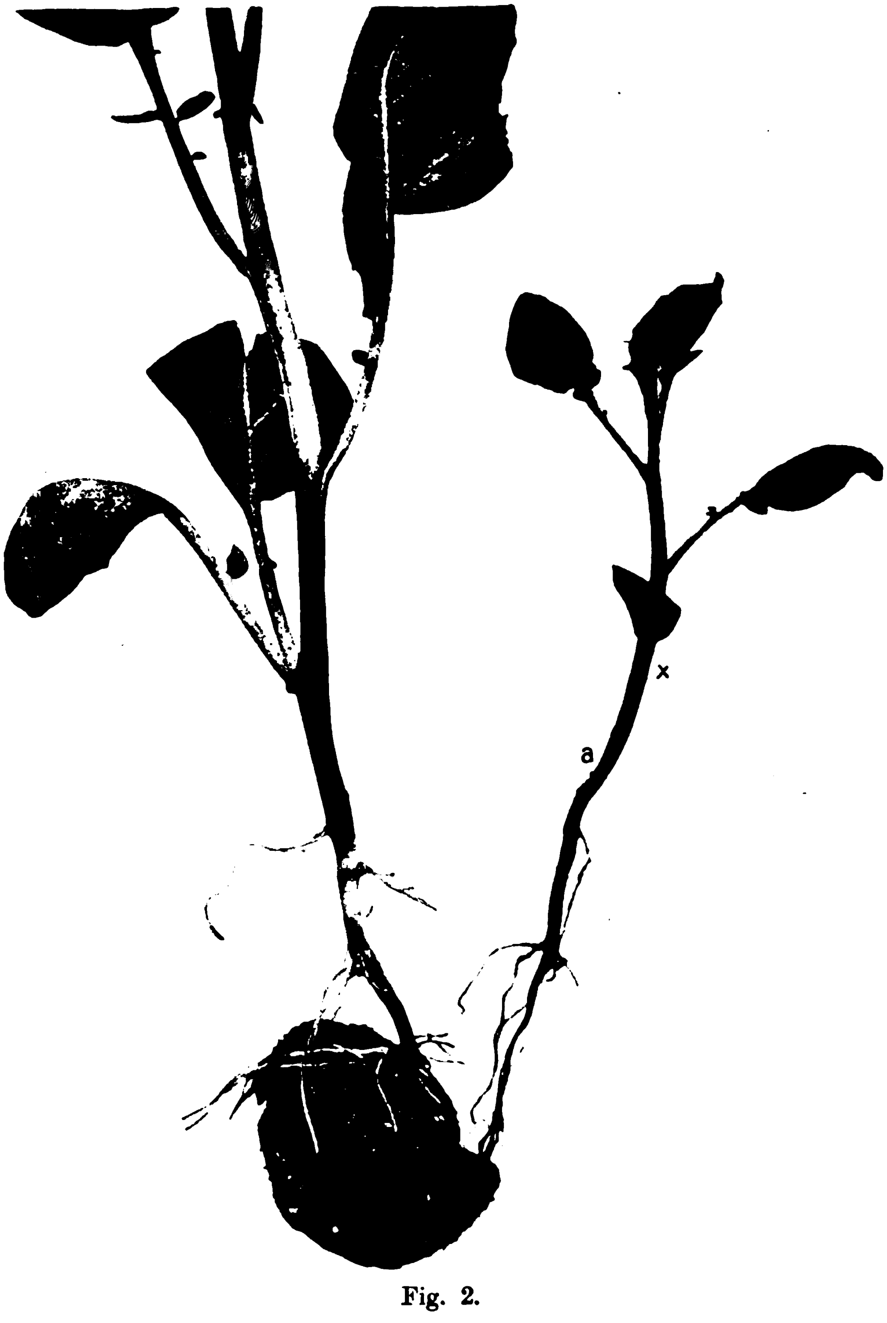


Fig. 2.

In one of the boxes at the high temperature the first shoot came up March 18 and two more appeared March 20. On March 22, seven of the tubers had shoots so tall that it was necessary to replace the pane of glass with the small glass house referred to earlier. The shoots continued to grow without showing Phytophthora infection until April 6, when the majority of the plants were 6 to 10 inches tall. Several of the plants were very spindling, due partly to the reduced light and partly, doubtless, to the diseased parent tubers. Examination made on April 7 showed that the stem of one of the smaller plants was becoming waterlogged and yellowish white at the surface of the soil, while just below the surface it was light brown in color. It was possible to see a glistening white growth sprinkled here and there on the surface of the discolored stem. A microscopic examination of this growth proved it to be the fruit of Phytophthora infestans. The infected plant had five leaves, was about 4 inches tall and was spindling (Plate I, fig. 2 a). The other plants in this box were two or three times as tall as the infected one, its small size being due in part to its youth and slower growth. The infected plant was very carefully dug up and it was found that two shoots arose from the tuber which produced the diseased specimen, one of which was healthy and about three times as tall as the diseased shoot. The parent tuber was about two-thirds decayed, the remaining portion, however, was quite firm. It was the firm portion of the mother tuber which gave rise to the two shoots in question. The stem of the diseased shoot below the surface of the soil where it was attached to the parent tuber was blackened and dead. Nearer the surface of the soil, however, the stem was lighter colored and evidently had been killed more recently, showing that the infection had traveled up the stem from below. Just at the surface of the soil and one centimeter above on the stem, the tissues were water-logged. Still further up on the stem the tissues were sound. This case is of special interest since it shows both healthy and diseased plants growing from the same mother tuber. The box in which this specimen had grown was immediately removed to another house and disinfected so as to avoid any possibility of stray infection to other experiments under way in the same house. Sections were made of the tuber at the point where the diseased plant was attached and Phytophthora mycelium was found to be abundant in it. It was also present in the upper two-thirds of the infected portion of the stem, i. e. up to the point marked X; the lower third was so completely destroyed that the mycelium could not be found.

The other box kept at 23° to 27° C. showed no infection although it was kept under observation for 38 days. Six of the tubers produced healthy plants; the other two, none at all. When this latter experiment was discontinued some of the plants were a foot tall. An examination of some of the tubers at this time showed that they were all rotted and that the young plants were getting their nourishment from the soil. The two controls remained free from disease.

The box containing diseased tubers kept at 15° to 20° C. produced healthy plants from four of the tubers. The remaining four rotted in the soil. This box was kept under observation until April 30. No infections developed. At this date the plants were dug up and the tubers examined. They were dead, which, of course, excluded any further possibility of infection by the mycelium. The control kept on this box remained free from infection also.

Numerous other experiments with similar results have been made, all of which will be described in detail in a later paper. These studies show clearly two facts, (1) that the mycelium of Phytophthora infestans in infected tubers may spread into the young sprouts, as has been generally supposed for a long time; and (2) that the mycelium may spread from the

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

diseased parent tuber into the above ground shoot. Once in the shoot it may migrate up through the stem to the surface of the soil and produce aerial spores which may become the source of secondary infections.

Nachdruck verboten.

Influence des métaux sur le développement de l'Aspergillus niger cultivé sur liquide de Raulin.

Par **M. Bornand,**
Laboratoire du Service Sanitaire Lausanne.

Avec 4 figures.

Les expériences de Raulin[1]) relatives à la culture de l'Aspergillus niger dans un milieu de culture chimiquement défini, l'action favorisante ou retardatrice de certains sels de métaux sur le développement de cette moisissure ont été laissés dans l'oubli pendant environ 30 ans.

Ce n'est que ces dernières années que Bertrand et ses éléves ont repris cette étude et se sont appliqués surtout à démontrer le rôle que jouent certains sels du liquide de Raulin sur le développement d'A. niger et en particulier les sels de Fer, de Zinc et surtout d'un élément n'entrant pas dans la composition du liquide de Raulin: le Manganèse.

Monsieur le Professeur B. Galli-Valerio, directeur de l'Institut d'Hygiène et de Parasitologie de l'Université de Lausanne, partant de l'expérience de Raulin sur le développement d'Asp. niger dans un récipient en Argent, me conseilla d'étudier non pas l'action des différents sels du liquide de Raulin sur le développement de l'Aspergillus niger, mais d'étudier quelle influence pouvaient avoir sur le développement de cette moisissure une série de métaux servant de récipients pour ces cultures sur liquide de Raulin.

Je me permets de remercier sincèrement Monsieur le Professeur Galli-Valerio pour les conseils et indications qu'il m'a donnés au cours de ces recherches.

Pour mes expériences, j'ai fait confectionné une série de capsules de différents métaux: Argent, Aluminium, Cuivre, Fer, Etain, Plomb, Zinc, Nikel, que je plaçais dans des plaques de Petri; je stérilisais le tout à l'autoclave et j'ajoutais 15—20 ccm de liquide de Raulin stérile et j'ensemençais les spores d'Asp. niger. Les premiers essais ne furent pas brillants, même dans la capsule témoin en verre; évidemment cela provenait du manque d'Oxygène; c'est pourquoi je remplaçais le couvercle de la plaque de Petri par un flacon d'Erlenmeyer dont le fond avait été coupé et qui recouvrait exactement la capsule du métal et s'emboitait dans le fond d'une plaque de Petri. Les dimensions de cet appareil étaient: diamètre de la plaque de Petri: 8 cm, diamètre de la capsule de métal 6 cm 5, hauteur 1 cm 5; diamètre de l'extrémité inférieure du flacon d'Erlenmeyer coupé: 7 cm 5, hauteur 10 cm 5 (photo 1).

Après stérilisation à l'autoclave, adjonction de 20 ccm de liquide de Raulin stérile et ensemencement de spores d'Asp. niger, les appareils étaient placés à l'étude à 35°.

---

[1]) Etudes chimiques sur la végétation. Thèse de Paris.

Raulin a été le premier qui a signalé l'action d'un métal sur le développement de l'Aspergillus niger, et utilisant l'Argent, il lui attribue un pouvoir antiseptique.

„En essayant de faire végéter l'Aspergillus dans un vase d'Argent, j'ai été tout d'abord fort surpris de n'obtenir que des traces à peine appréciables de mycélium[1]).

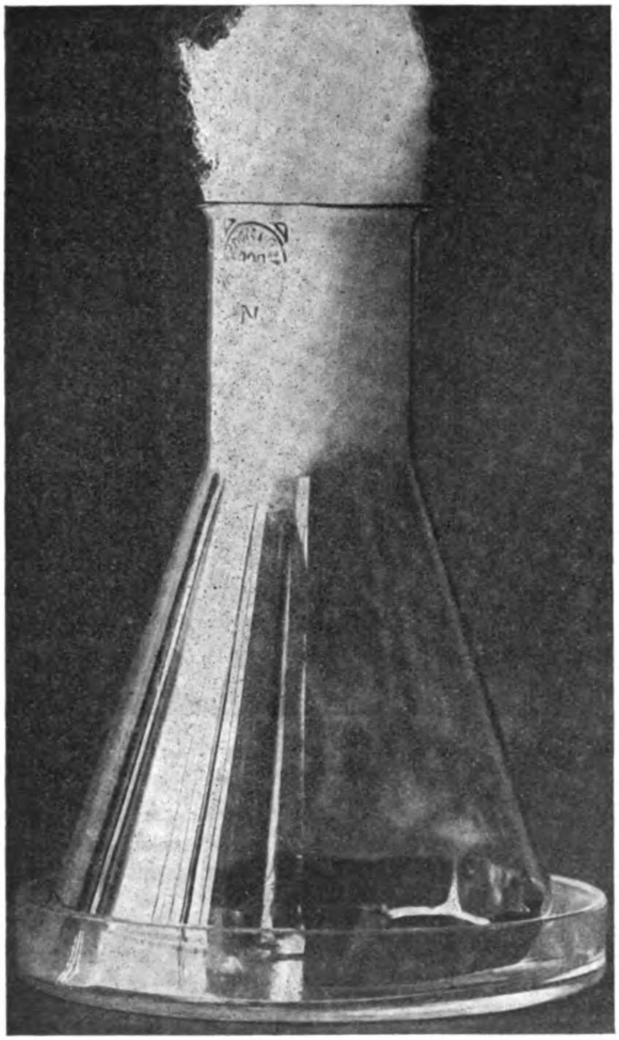


Photo 1.

Depuis 1909, Monsieur le Professeur Galli-Valerio montre dans ses cours, des cultures sporulées d'Asp. niger conservées dans des éprouvettes en verre et qui avaient été cultivées dans un godet en Argent pur; il a toujours constaté un retard dans la sporulation. Cette observation n'a jamais été publiée.

Au cours de mes recherches, parurent successivement deux notes de

---

[1]) Thèse citée; Nouv. édit. Paris 1905. p. 134.

J. Cadur et Thiry[1]) et de Hugues Clément[3]) relatives à la culture de l'Aspergillus niger dans des vases d'Argent.

Ces deux auteurs ont constaté qu'Asp. niger se développait aussi bien dans des vases d'Argent que les cultures témoins, et que la présence d'Argent n'est pas incompatible avec le développement d'Asp. niger.

Voici maintenant le résultat de mes expériences:

I. Action de l'Argent sur le développement d'Aspergillus niger.

Ensemencement de spores d'Aspergillus niger:
1. dans une capsule en Argent pur.
2. dans une capsule en verre.

Les deux capsules contenaient 15 ccm de liquide de Raulin.

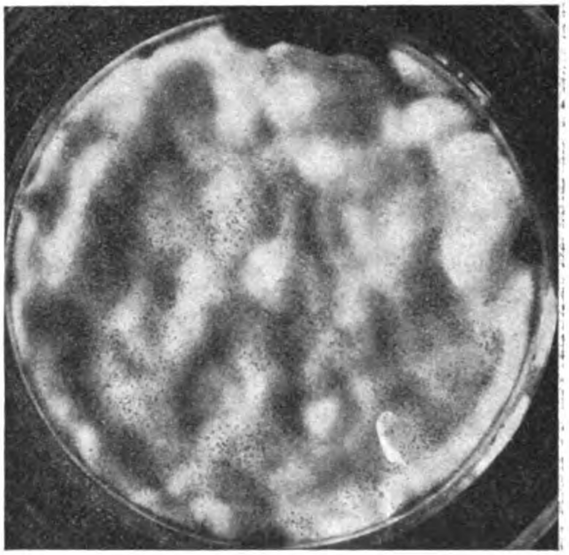


Photo 2.

Développement après 24 heures:

1. Capsule en verre: Léger développement sur presque toute la surface.
2. Capsule en Argent: Pas de développement.

Développement après 48 heures:

1. Capsule en verre: Tout le liquide est envahi par un épais mycélium, commencement de sporulation.
2. Capsule en Argent: Commencement de développement de 2 colonies d'environ 4 mm de diam.

Développement après 3 jours:

Caps. Verre: En pleine sporulation (phote 2).

Caps. Argent: Développement de 4 colonies de 1 ccm environ de diamètre, légère sporulation (photo 3).

Développement après 4 jours:

Caps. Verre: La culture est noire de spores.

Caps. Argent: Mycélium développé sur presque toute la surface; sporulation peu avancée.

---

[1]) Compt. Rend. Soc. de Biol. 1913. p. 487; Ibidem p. 749.

Développement après 5 jours:

Caps. Verre: Le mycélium commence à se dessècher.

Caps. Argent: Sporulation peu avancée, mais toute la surface est couverte par le mycélium.

Développement après 6 jours:

Caps. Verre: Mycélium dessèché.

Caps. Argent: Le mycélium commence à se dessècher, la sporulation faible est aviétée.

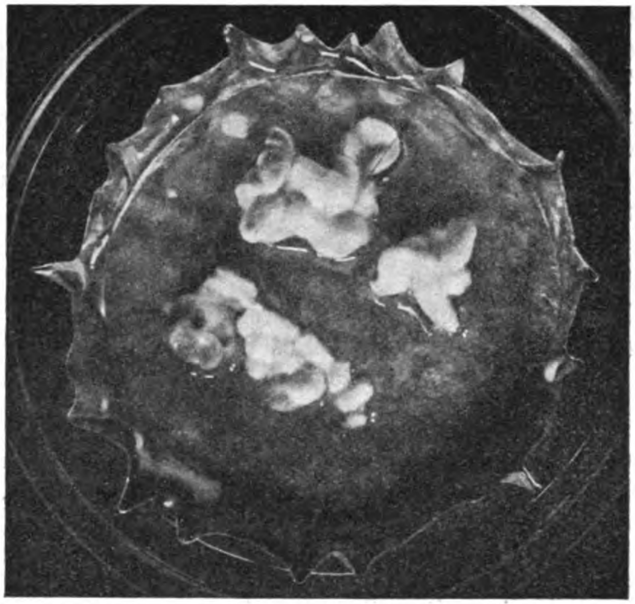


Photo 3.

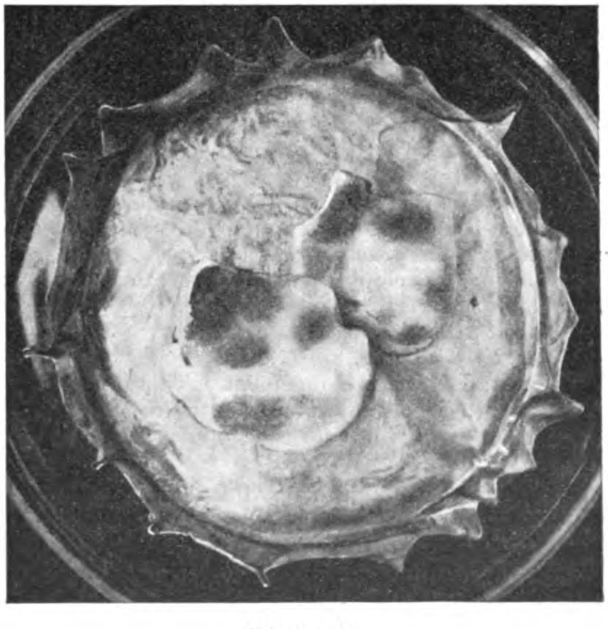


Photo 4.

Les expériences ont été faites plusieurs fois pour constater s'il y avait des différences dans le développement des cultures.

a) Le développement dans la capsule de verre était toujours constant, la sporulation était complète entre le 3e et 4e jour.

b) Avec la capsule d'Argent, j'ai pu constater deux faits:

1. Le mycélium après 4—5 jours envahissait toute la surface du liquide contenu dans la capsule et la sporulation même jusqu'au 7e jour était très faible.

2. Un certain nombre de spores germaient et donnaient en deux ou trois endroits de grosses colonies qui se développaient en hauteur plutôt qu'en surface, la sporulation commençait après le 3e jour de l'ensemencement et était complète après le 6e jour (photo 4), puis le mycélium de dessèchait.

Le résultat de ces expériences et de mes observations ne concorde ni avec celles de Raulin qui prétendait à l'absence de développement, ou à un développement très grèle d'Asp. niger cultivé dans une capsule en Argent, ni avec celles de Cadur et Thiry et de Clément qui ne constataient aucune différence avec la culture témoin.

En résumé, on peut conclure que des spores d'Asp. niger cultivées sur liquide de Raulin dans une capsule en Argent:

1. Ont leur développement retardé, beaucoup moins abondant que celles cultivées dans une capsule témoin en verre,

2. que l'Argent n'entrave en rien la sporulation du mycélium, mais que cette sporulation est beaucoup plus faible que dans la capsule témoin.

J'ai fait quelques expériences pour me rendre compte si Asp. niger pouvait s'adapter et se développer d'une façon normale cultivé sur liquide de Raulin dans une capsule d'Argent. A cet effet, je prenais les spores d'un premier développement sur capsule en Argent et je les ensemençais de nouveau sur liquide de Raulin dans une capsule d'Argent et ainsi de suite à quatre reprises.

Je n'ai pas constaté un développement beaucoup plus abondant au quatrième passage qu'au premier.

II.

Ensemencement de Spores d'Aspergillus niger dans liquide de Raulin contenu dans capsules de:

Verre, Aluminium, Plomb, Zinc, Cuivre, Nikel, Fer, Etain, Platine, Mercure[1]).

Developpement à 35°.

Développement après 24 heures.

Verre: Léger développement sur toute la surface.
Aluminium: Léger développement sur toute la surface mais moins fort que Verre.
Plomb: Absence de développement.
Zinc: ,, ,, ,,
Cuivre: ,, ,, ,,
Nikel: ,, ,, ,,
Fer: ,, ,, ,,
Etain: ,, ,, ,,
Platine: Léger dév. sur toute la surface comme verre.
Mercure: Absence de développement.

Développement après 48 heures.

Verre: Epais mycélium sur toute la surface; commencement de sporulation.
Aluminium: Mycélium aussi abondant que dans capsule de Verre, mais pas de sporulation.
Plomb: Développement d'une dizaine de colonies de la grosseur d'une tête d'épingle.
Zinc: Développement faible, mycélium peu abondant et surtout constitué par de petites colonies isolées.
Cuivre: Développement sur toute la surface de petites colonies, liquide légèrement coloré en vert.
Nikel: Absence de développement.
Fer: ,, ,, ,,
Etain: Léger développement.
Platine: Epais mycélium sur toute la surface; commencement de sporulation.
Mercure: Absence de développement.

Développement après 3 jours.

Verre: Sporulation presque complète.
Aluminium: Sporulation faible.
Plomb: Développement d'un grand nombre de colonies occupant la moitié de la surface. Nombreuses têtes sporifères.
Zinc: Développement plus abondant qu'après 48 heures, sur quelques colonies commencement de sporulation.

---

[1]) Le mercure était versé dans une capsule de verre du diamètre des autres capsules et d'une épaisseur de 0,5 ccm.

Cuivre: Développement sur presque toute la surface de colonies vermiculées, colorées en vert.

Nikel: Absence de développement.

Fer: „ „ „

Etain: Léger développement, plus abondant qu'après 48 heures.

Platine: Sporulation presque complète.

Mercure: Absence de développement.

Développement après 4 jours.

Verre: Surface du liquide noire de Spores.

Aluminium: Sporulation peu avancée.

Plomb: Développement et sporulation plus avancée qu'après 3 jours, développement en hauteur.

Zinc: La développement n'augmente pas, par contre deux colonies sont entièrement sporulées.

Cuivre: A quelques endroits, le mycélium est vert foncé et complètement vermiculé.

Nikel: Absence de développement.

Fer: Développement de quelques petits colonies.

Etain: Développement sur presque toute la surface, mycélium légèrement vermiculé, absence de sporulation.

Platine: Forte sporulation, mais moins abondante que dans la capsule de verre **témoin.**

Mercure: Absence de développement.

Développement après 5 jours.

Verre: Sporulation complète, il n'y a plus de liquide, commencement de dessèchement du mycélium.

Aluminium: Faible sporulation.

Plomb: La sporulation est un peu plus avancée que le 4e jour.

Zinc: Le quart environ de la capsule est envahi par de petites colonies grèles; sporulation sur quelques unes.

Cuivre: Toute la capsule est envahie par le mycélium coloré en vert.

Nikel: Développement d'une colonie de 2 mm de diamètre.

Fer: Peu de développement.

Etain: Toute la surface est envahie par un mycélium légèrement vermiculé; absence de sporulation.

Platine: Forte sporulation, toujours moins abondante que dans la capsule de verre témoin.

Mercure: Absence de développement.

Développement après 6 jours.

Verre: Mycélium desséché.

Aluminium: Le mycélium se dessèche, la sporulation est faible.

Plomb: Mycélium couvrant toute la surface, sporulation continue mais faiblement.

Zinc: Développement un peu plus abondant qu'après 5 jours, sporulation peu avancée.

Cuivre: Le mycélium commence à se dessècher.

Nikel: Développement de quelques petites colonies.

Fer: Développement de 4 colonies de 3 mm environ de diamètre.

Etain: Développement abondant sur toute la surface, commencement de sporulation.

Platine: Mycélium se dessèche, sporulation complète.

Mercure: Absence de développement.

Développement après 7 jours.

Verre: Mycélium desséché.

Aluminium: Mycélium desséché, sporulation faible.

Plomb: Sporulation continue, faiblement.

Zinc: Quelques colonies sont entièrement sporulées.

Cuivre: Dessèchement du mycélium.

Nikel: Développement peu avancé.

Fer: Développement un peu plus abondant qu'après 6 jours.

Etain: Mycélium se dessèche, peu de sporulation.
Platine: Mycélium desséché.
Mercure: Absence de développement.

Les observations ont été suivies jusqu'au 10e jour, à ce moment le mycélium développé sur les différentes capsules était complètement desséché; depuis le 7e au 10e jour, le développement du mycélium, et la sporulation dans les capsules en Plomb, en Zinc, en Cuivre, en Nikel, en Fer et Etain n'ont pas progressé d'une façon très sensible, il semble que l'arrêt de développement et de sporulation commence à partir du 7e jour.

Les expériences ont été faites à trois reprises différentes et j'ai obtenu sensiblement les mêmes résultats.

En résumé, d'après les résultats énoncés plus haut, il résulte que des spores d'Asp. niger ensemencées dans du liquide de Raulin contenu dans des capsules de différents métaux ne se développent pas d'une façon normale, et le mycélium obtenu ne sporule que difficilement, exception faite pour le Platine, ou même ne se développent pas du tout. Cela devrait provenir évidemment de la dissolution du métal par le liquide de Raulin qui est acide. A ce propos j'ai recherché qualitativement au bout de combien de temps le métal sur lequel on faisait l'expérience, était dissous dans le liquide de Raulin:

Placés à l'étuve à 35°.

Métaux	12 h	24 h	48 h	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours	10 jours
Verre	0	0	0	0	0	0	0	0
Argent	0	0	0	0	0	0	0	0
Aluminium	0	0	0	0	0	0	0	0
Plomb	0	0	traces	présence	présence	présence	présence	présence
Zinc	0	traces	traces	présence	présence	présence	présence	présence
Cuivre	traces	traces	présence	présence	présence	présence	présence	présence
Nikel	0	0	traces	présence	présence	présence	présence	présence
Fer	traces	traces	présence	présence	présence	présence	présence	présence
Etain	0	0	0	traces	traces	présence	présence	présence
Platine	0	0	0	0	0	0	0	0
Mercure	0	0	0	0	0	0	0	0

D'après ce tableau, on constate que c'est le fer qui est le plus rapidement attaqué, puis viennent le Cuivre, le Zinc, le Plomb, le Nikel et l'Etain. Le Mercure n'est pas attaqué, mais comme ce métal émet des vapeurs même à la température ordinaire, elles agissent en entravant le développement de la moisissure.

Je n'ai pas pu déceler chimiquement la présence soit de l'Argent de l'Aluminium et du Platine dans le liquide de Raulin même après 10 jours.

Au point de vue de la toxicité, pour A. niger, l'Argent le serait plus que l'Aluminium et ce dernier plus que le Platine, puis viendraient le Nikel, le Fer, le Plomb, le Zinc, le Cuivre et l'Etain.

Les cultures de l'Aspergillus niger sur capsules de verre et d'Aluminium ont donné une formation de mycélium identique au point de vue du temps et de la quantité, mais la sporulation dans ce métal n'a jamais été complète et a toujours commencé beaucoup plus tard. Pour le Platine, la sporulation a semblé avoir présenté un léger retard. — Quand au développement d'Asp. niger sur les autres métaux, on peut dire qu'il y a eu pour tous 1. un grand retard dans le développement du mycélium, que même ce développement n'a jamais été identique à celui de la capsule de verre témoin.

2. La sporulation n'a jamais été complète.

Dans un des tableaux indiqués, j'ai mentionné qu'après le 3e jour, le mycélium d'Asp. niger cultivé dans la capsule de cuivre présentait un mycélium vermiculé et coloré en vert. Cette forme vermiculée a été observée par B. Sauton[1]) dans une expérience qu'il faisait en supprimant le Sulfate de fer du liquide de Raulin. — Sauton considère ce mycélium lisse et vermiculé comme une variété morphologique qui ne comporte pas d'appareil sporifère et il constate que si on ensemence ce mycélium vermiculé dans un liquide de Raulin complet, il perd la propriété de sporuler.

Le mycélium vermiculé coloré en vert provenant de la culture sur la capsule de Cuivre, a été ensemencé sur du liquide de Raulin contenu dans une éprouvette en verre. J'ai obtenu au bout de 4 jours un commencement de développement constitué par un fin mycélium qui se tenait dans le fond de l'éprouvette; la culture a envahi peu à peu le liquide et au bout de huit jours j'avais la sporulation complète.

3e Série d'expériences.

Je préparais deux liquides de Raulin, dans l'un, je supprimais le sulfate de fer et je plaçais mon milieu nutritif dans une capsule de fer; dans l'autre je supprimait le Zinc et plaçais mon liquide dans une capsule en Zinc.

Dans une série d'expériences, Raulin[2]), Sauton[3]), Bertrand et Javillier[4]) ont démontré que des liquides de Raulin exempt soit de $FeSO_4$ soit de $ZnSO_4$ n'étaient pas favorables au développement et à la sporulation d'Aspergillus niger. Je voulais me rendre compte si la petite quantité de Zn ou de Fer que dissolvait le liquide de Raulin pouvait remplacer le $FeSO_4$ et $ZnSO_4$ contenus dans le milieu type.

Les résultats que j'ai obtenus étaient semblables à ceux mentionnés dans mes expériences précédentes c'est à dire que le développement était gêné et qu'au bout de 4 à 5 jours je n'obtenais que quelques rares colonies dont quelques unes cependant avaient sporulé (pour la culture dans la capsule de Zn seulement). Evidemment comme dans les expériences précédentes, une trop grande quantité de métal dissous entravait le développement.

Dans cette troisième série d'expériences je plaçais aussi mes liquides de Raulin dépourvus de $FeSO_4$ ou de $ZnSO_4$ dans des capsules de verre tenant lieu de témoins et j'ensemençais des spores d'Asp. niger. J'ai obtenu dans les deux cas un développement, mais beaucoup moins abondant que dans une capsule de verre témoin contenant du liquide de Raulin complet et même à quelques endroits, une légère sporulation. Le mycélium provenant du liquide de Raulin sans fer n'a pas présenté cet aspect vermiculé dont parle Sauton[5]).

---

[1]) Annal. Instit. Pasteur. 1911. p. 922.

[2]) Thèse citée. p. 169.

[3]) Compt. Rend. Ac. Scienc. T. 151. 1910. p. 241. — Ann. Instit. Pasteur. 1911. p. 923. — Compt. Rend. Soc. biolog. 1913. p. 263.

[4]) Compt. Rend. Ac. Scienc. T. 146. 1907. p. 1212; 1908. p. 365. — Ann. Instit. Pasteur. 1908. p. 720; 1912. p. 515.

[5]) Ann. Inst. Pasteur. 1911. p. 122.

Conclusions.

Il résulte des expériences que je viens de décrire:

a) Que des spores d'Aspergillus niger cultivées dans une capsule d'Argent sur liquide de Raulin, 1. Ont leur développement gêné. 2. Que le mycélium qui se forme subit un retard dans son développement, mais donne quand même lieu à la formation de spores.

3. Qu'il ne m'a pas été possible par une série de repiquages d'arriver à habituer Asp. niger à se développer d'une façon normale dans le liquide de Raulin contenu dans une capsule d'Argent.

4. Après 10 jours de contact du liquide de Raulin avec la capsule d'Argent, l'analyse chimique n'a pas permis de déceler la présence d'Argent.

b) 1. Que des capsules de métaux lourds ne se prêtent pas à l'étude du développement d'Aspergillus niger cultivé sur liquide Raulin.

2. Que le développement de la moisissure est gêné par la présence du métal dissous dans la capsule, exception faite pour l'Aluminium et le Platine.

c) Qu'on ne peut obtenir un développement normal d'Aspergillus niger en remplaçant les sels de fer et de Zinc contenus dans le liquide de Raulin, par les métaux eux-mêmes.

Lausanne, le 18 août 1913.

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Bornand, M., Influence des métaux sur le développement de l'Aspergillus niger cultivé sur liquide de Raulin, p. 488.

Edwards, S. F., Fruity or Sweet Flavor in Cheddar Cheese, p. 449.

Fred, Edwin Broun, A Study of the Formation of Nitrates in various Types of Virginia Soil, p. 455.

Melhus, I. E., The perennial Mycelium of Phytophthora infestans, p. 482.

Owen, W. L., The Occurrence of Saccharomyces Zopfii in Cane Syrups and Variation in its Resistance to high Temperatures when grown in Solutions of varying Densities, p. 468.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 17. November 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 20|22.
Ausgegeben am 13. Dezember 1913.

Nachdruck verboten.

Vergleichende Physiologie der Gattung Aspergillus.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von **Adalbert Blochwitz.**

Mehrfach sind physiologische Tatsachen zur Kennzeichnung neuer Spezies von Schimmelpilzen herangezogen, mehrfach Abweichungen in Wuchsform, Verarbeitung des einen oder anderen Nährstoffes, Temperatur-Optimum von einem Vergleichsmaterial oder auch nur von den Angaben des Nomenklators zur Aufstellung neuer Arten oder Varietäten benutzt, auch allgemein die Frage physiologischer Arten diskutiert worden.

Solche Beobachtungen haben diagnostisch wenig Wert, solange sie vereinzelt bleiben, solange nicht der Nachweis erbracht ist, daß

1. alle Angehörigen einer „guten Art“ sich tatsächlich in allen Punkten physiologisch gleich verhalten; daß
2. Angehörige morphologisch verschiedener Arten — speziell der voneinander zu unterscheidenden — sich tatsächlich auch physiologisch verschieden verhalten; daß
3. etwa festgestellte Unterschiede im Laufe vieler Generationen, unter gleichen Lebensbedingungen gezogen, sich konstant erhalten.

Es ist somit zunächst die natürliche Variationsbreite der einzelnen „Arten“ und die der einzelnen „Stämme“ festzustellen.

Auch für die Lösung von Fragen vom rein physiologischen Gesichtspunkt aus ist dies erforderlich: wenn Resultate, an einem A. niger gewonnen, nicht einmal für jeden niger gelten, so ist ihre Verallgemeinerung für „Aspergillus“ oder gar für „Schimmelpilze“ erst recht unzulässig. A. niger repräsentiert nun gerade nicht den physiologischen Typus der Gattung, sondern steht weit ab am Ende einer langen Reihe.

Untersucht wurde das physiologische Verhalten bei etwa 40 Aspergillen aller z. Z. lebend erhältlichen Arten, teils zu verschiedenen — etwa 20 — Arten gehörig, teils in gleiche Arten einzuordnen, aber nachweislich aus verschiedenen Ländern und Erdteilen stammend.

Es ergab sich dabei das überraschende Resultat:

ad I und II: beide Voraussetzungen treffen nicht zu;

ad III wird eine Entscheidung experimentell nicht so rasch möglich sein; einige Anhaltspunkte geben hier die in „technischen“ Betrieben seit langem spezialisierten Pilze.

Als Grundzug aller Versuchsreihen ließ sich erkennen:

Morphologisch ähnliche, aber deutlich und konstant verschiedene Arten verhalten sich physiologisch gleich oder ähnlich. Verschiedene Funde morphologisch übereinstimmender Formen können in mancher Hinsicht größere Abweichungen zeigen als ähnliche, aber sicher unterscheidbare Formen.

Je ähnlicher die Formen, desto ähnlicher die Lebensweise.

Dadurch wird einerseits die diagnostische Verwertung physiologischer Merkmale meist mehr oder weniger illusorisch gemacht; auf der anderen

Seite aber gewährt diese Erkenntnis oft ungeahnte Einblicke in die verwandtschaftlichen Zusammenhänge und damit auch auf den systematischen Wert der einzelnen morphologischen Merkmale. Besonders die Untersuchung der Farbstoffe ist diagnostisch wie systematisch ungemein fruchtbar

Es läßt sich so an Hand der Gesamtheit der Tatsachen ein Stammbaum aufstellen.

Das Oxalsäure-Bildungsvermögen.

Oxalsäure-Bildung war bisher nur bei A. niger bekannt, ist indes in der Gattung ziemlich verbreitet.

Diejenigen Formen, welche Oxalsäure bilden, tun dies unter den erforderlichen Bedingungen regelmäßig, die übrigen nie.

Quantitativ bestehen nicht nur zwischen den einzelnen Arten, sondern vor allem auch zwischen verschiedenen Stämmen derselben Art große und konstante Unterschiede, bei den meisten geht die Bildung nur bis zu 0,2 bis 0,4 n/100 Azidität gegen Phenolphthaleïn.

In Am̄NO_3-Lösung wird fast nie Oxalsäure produziert, außer von einem Stamm von A. niger, welcher durch stets enorme Mengen der Säure auffiel.

Bei optimalen Temperaturen entsteht auch bei $CaCO_3$-Zusatz in Am̄NO_3-Lösung keine Oxalsäure.

Im System setzen die Oxalsäurebildner 3 Gruppen morphologisch und physiologisch ähnlicher Arten zusammen.

Einfluß der Reaktion des Nährmediums.

Im allgemeinen wird angenommen, daß Schimmelpilze saure Substrate bevorzugen, während Bakterien schwach alkalische oder mindestens neutrale brauchen. Doch sind auch gegenteilige Ansichten laut geworden teils für einzelne Fälle, teils als allgemein giltig.

Sämtliche Formen wurden einerseits bei anfangs neutraler oder durch $CaCO_3$ dauernd neutral erhaltener Reaktion gezogen, andererseits bei verschieden stark saurer und alkalischer, von 1/100 bis zu 1/10 Normalität steigend, sowohl mit KNO_3 wie Am̄NO_3 (H_3PO_4, H_2SO_4, Fruchtsäuren, $Mg(OH)_2$, KOH, K_2CO_3).

Der Einfluß wurde gemessen an der Schnelligkeit der Entwicklung, am Gewicht der „Ernte“ und der Menge der erzeugten Fortpflanzungsorgane, durch die Grenze der zulässigen Azidität und Alkalität, zugleich die Änderung der Reaktion im Stoffwechsel durch Titrieren am Ende berücksichtigt.

Es lassen sich drei Gruppen mehr oder weniger deutlich trennen: säureliebende, säurescheue, indifferente.

Sämtliche Oxalsäurebildner gedeihen schlecht oder gar nicht auf dauernd oder stärker alkalischen Lösungen, vertragen dagegen höhere Säurekonzentrationen.

Dieser Satz läßt sich nicht mit allgemeiner Geltung umkehren. Je stärker das Oxalsäure-Bildungsvermögen, desto größer die Empfindlichkeit gegen OH-Ionen, desto größer die Toleranz gegen Säuren.

Dabei ist jedoch hier wie allgemein ein Unterschied zu machen zwischen organischen und anorganischen Säuren, sowie unter den verschiedenen Mineralsäuren. Dieser Unterschied ist bei verschiedenen Spezies verschieden groß. So ist A. Wentii trotz reichlicher Oxalsäure-Produktion höchst empfindlich gegen HNO_3, aus Am̄NO_3 stammend.

Die nicht oxygenen Arten sind in ihren Ansprüchen verschieden: manche sind empfindlich gegen höhere Säuregrade, indifferent gegen größere Mengen von Karbonaten, manche umgekehrt, manche vertragen beide gleich gut oder gleich schlecht.

Ausgesprochen gefördert wird keine Art durch Säuren, noch weniger durch Alkalien, am wenigsten durch $Mg(OH)_2$.

Organischen Säuren gegenüber — als freie Säuren oder Ammonsalze — besteht ein prinzipieller Unterschied: die oxyphilen bauen sie nur z. T. ab bis zu einer gewissen, höheren Azidität, die Oxalsäurebildner nur bis zur Oxalsäure, die anderen zu Kohlensäure; von den oxyphoben zerstören die einen sie vollständig bis zur Neutralität, die anderen greifen sie nicht an, so daß die Anhäufung freier Säure aus Am̄-Salz eventuell bis zum Selbstmord führen kann.

Die oxyphilen Arten werden häufiger gefunden; sie sind fast omnivor, an alle Außenbedingungen in weiten Grenzen anpassungsfähig, sie neigen sehr zum Variieren, d. h. zur Bildung von konstanten Varianten. Die oxyphoben Arten sind offenbar viel seltener, wiewohl reich an Artenzahl; sie sind in ihren morphologischen Eigenschaften schärfer umschrieben, also weniger variierend — unbeschadet großer Abweichungen innerhalb eines Stammes; sie sind in ihren Ansprüchen an Ernährung, Reaktion usw. weit mehr spezialisiert; sie werden von Bakterien leicht überwuchert. Sie stehen vielleicht z. T. auf dem Aussterbeetat.

Ammon- und Nitraternährung.

Während — bis auf einen Ammoniakpilz — alle mit KNO_3 gleich gut gedeihen, werden viele durch die aus $\bar{Am}NO_3$ freiwerdende HNO_3 mehr oder weniger benachteiligt, nur die oxyphilen im allgemeinen nicht. Besonders leidet die Konidienbildung darunter, die „Ernte“ oft gar nicht.

Ursache der Verschiedenheit dürfte in verschiedener Ausbildung bzw. Hemmung reduzierender Enzyme zu suchen sein.

Enzymproduktion.

1. Das proteolytische Vermögen

wurde in üblicher Weise verglichen durch die Geschwindigkeit der Gelatineverflüssigung bei optimaler Reaktion, aber gleicher Temperatur.

2. Das amylolytische Vermögen

wurde gemessen durch die Geschwindigkeit der Entwicklung und Ausbreitung auf Stärkekleister möglichst günstiger Konzentration mit KNO_3 bzw. $\bar{Am}NO_3$ als N-Quelle, durch die Menge des in bestimmter Zeit über Bedarf produzierten Zuckers.

Außer A. glaucus verzuckern sämtliche Arten. Geschwindigkeit der Enzymbildung und Intensität der extrazellularen Zuckeranhäufung lassen gewisse, unter ähnlichen Arten meist nicht bedeutende Unterschiede erkennen.

Auffällig ist das Verhalten von A. glaucus, des typischen Brotschimmels. Duclaux und Schäffer wollen Diastase gefunden haben; nach Wehmer ist das Stärkeverzuckerungsvermögen minimal, — wenig wahrscheinlich: entweder erzeugt der Pilz kein Enzym oder in ausreichender Menge. Ca. 60 Kulturen von 6 verschiedenen Provenienzen des Pilzes bei den verschiedensten Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen gingen nicht auf. Doch könnte das Enzym erst in späteren Entwicklungsphasen auftreten. Überträgt man Keimschläuche oder junge Mycelflocken oder Polster verschiedenen Alters von Nährlösung oder Gelatine auf Stärkekleister mit KNO_3 oder $AmNO_3$, so breiten sie sich im Diffusionsfelde aus, doch nur so lange die anhaftenden Zuckermengen reichen. Daraus geht hervor, daß A. glaucus auf Brot nur auf Kosten der wenigen Prozente Dextrin und Zucker leben kann.

3. Das steatolytische Vermögen.

Dem Fett gegenüber sind zwei Gruppen scharf geschieden: auf Magermilch verzehren die einen das Fett vollständig, die anderen greifen es nicht an. Bestimmt wird der Fettkonsum durch Benzinextraktion und Abdunsten des Benzins.

4. Andere organische Stoffe.

Von solchen wurden Eiweißstoffe und intermediäre Stoffwechselprodukte, sowie Kohlehydrate, Alkohole usw. geprüft, ließen aber meist nur geringe oder undeutliche quantitative Unterschiede unter ähnlichen Arten erkennen. Allgemein sind Albumine, Nukleoproteïn, Pepton, Amidosäuren u. ä. als N-Quelle ebenso gut wie ungeeignet als C-Quelle. Auffällig erscheint, daß gewisse energiereiche Stoffe — ebenso wie ungünstige Reaktion — nur ein dürftiges Mycel aufkommen lassen, ohne die Fortpflanzung zu beeinträchtigen, während wieder andere das Mycel wuchern und ganz oder fast steril bleiben lassen.

Einfluß der Temperatur.

Auf Stärkekleister mit Zucker und $\bar{\bar{A}}\text{m}NO_3$ bzw. KNO_3 bei möglichst günstigem Wassergehalt wurde in Stufen von 5 zu 5 Grad die Geschwindigkeit der Entwicklung und Ausbreitung gemessen, die Menge der erzeugten Fortpflanzungsprodukte geschätzt, um die Kardinalpunkte zu bestimmen.

Rassen, welche in Dimensionen, Wuchsform, Ansprüchen an Reaktion und Feuchtigkeit geringe quantitative Abweichungen erkennen lassen, tun dies wohl auch in ihren Temperaturansprüchen, besonders hinsichtlich der Art der Vermehrung durch Perithecien, Sklerotien oder Konidien.

Funde derselben Art aus verschiedenen Klimaten ließen eine verschiedene Lage des Optimums nicht erkennen; doch waren diese sämtlich durch viele Jahre und Generationen schon hier im Laboratorium gezogen und dadurch vielleicht ein ursprünglicher Unterschied verwischt worden. Zur Lösung dieser diagnostisch wie ökologisch brennenden Frage ist aber ein viel umfangreicheres Vergleichsmaterial dringend erforderlich.

Die Säurebildner sind meist nicht ausgesprochen thermophil, sondern auf mittlere Lagen angewiesen (25°).

Einfluß der Feuchtigkeit.

Dauernd hohe Feuchtigkeit ist für viele Aspergillen keineswegs ein günstiger Faktor, am wenigsten für die Vermehrung. Bei den xerophilen Arten wurden deshalb obige Untersuchungen nicht nur auf Flüssigkeiten, sondern auch auf durchtränktem Fließpapier angestellt.

Nach demselben Verfahren wie oben wurde auch Minimum und Optimum des Wassergehaltes bestimmt, wobei der Stärkegehalt von 5 zu 5 Proz. stieg.

Von Bedeutung erscheint folgende, fast ausnahmslos geltende Regel: die säureliebenden, zumal die säurebildenden Arten wachsen und sporulieren üppig selbst auf Flüssigkeiten; die oxyphoben sind auch hydrophob; auf sehr feuchten Substraten werden sie tatsächlich sehr leicht von Bakterien überwuchert oder doch an der Bildung von Vermehrungsorganen gehindert, während diese durch größere Trockenheit leicht auszuschließen sind. Auch bedingt wohl Anpassung an den Säuregehalt von Früchten u. ä. Pflanzenteilen zugleich Anpassung an hohen Wassergehalt. Um indes einen Einblick in die ökologische Bedeutung dieser merkwürdigen Unterschiede zu ermöglichen, müßten weit mehr Notizen über Standorte und Fundorte vorliegen.

Einfluß des Lichtes.

Ausführliche Arbeiten s. in nächster Nummer.

Perithecien, Sklerotien und Eidamsche Blasenhüllen. Bei 3 Arten wurden Perithecien, bei 3 Arten Sklerotien, bei 3 Arten Eidamsche Blasenhüllen mit Sicherheit bisher nachgewiesen. Die Ausbildung der Perithecien bzw. Sklerotien ist entgegen bisherigen Anschauungen im wesentlichen eine Funktion der Temperatur, vor allem aber individueller Anlage, d. h. bei verschiedenen Stämmen derselben Art sehr verschieden reichlich.

Wuchsformen.

Morphologisch, speziell mikroskopisch übereinstimmende Formen zeigen unter gewissen, von Fall zu Fall verschiedenen Kulturbedingungen merkliche Verschiedenheiten in der Ausbreitung, Dichte usw. des Mycels, Neigung zu Lufthyphenbildung oder Mißbildungen, Dichte der Träger u. dgl. Solche Eigentümlichkeiten sind meist schwer in Worten zum Ausdruck zu bringen, welche ein Wiedererkennen durch andere sichern, auch oft in verschiedenen Abstufungen zu finden. Sie sind daher zur Charakterisierung der Art ungeeignet, gestatten freilich auf der anderen Seite, die Artenzahl ins Endlose zu vermehren. Über ihre erbliche Konstanz vgl. u. a. „Erblichkeit und diagnostischer Wert der Luftmycelbildung bei Schimmelpilzen". Zeitschr. f. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre.

Farbstoffe.

Die Bestimmung von Aspergillus-Spezies hält sich in erster Linie an die Farbe der Konidien bzw. der Konidiendecke. Diese schwankt nicht nur aus verschiedenen Ursachen, sondern die Bezeichnung der Nuancen nach konventionellen Farbennamen oder nach wirklich zuverlässigen Vergleichsobjekten bleibt stets etwas Unsicheres. Die Farbentabellen reichen hier nicht aus. Eine objektive Farbenbenennung gestattet nur das Spektrum. Versuche in dieser Richtung scheiterten vorläufig teils an der Schwer- oder Unlöslichkeit der Farbstoffe in den üblichen Lösungsmitteln, teils an der Unschärfe der sehr diffusen Spektra.

Wohl aber bietet gerade die Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln ein bequemes Mittel zur objektiven Charakteristik der einzelnen Stoffe, ebenso ihr Verhalten gegen Säure und Alkali oder andere Agentien.

Dazu ist Trennung von den Mycelfarbstoffen erforderlich. Auch diese sind in ihrem Verhalten gegen Lösungsmittel u. a. Chemikalien sehr abwechslungsreich und scharf definierbar. Abhängigkeit der Farbe von der Reaktion ist bei Mycel- noch viel allgemeiner als bei Konidienfarbstoffen.

Auf Verschiedenheit der Reaktion des Zellsaftes beruht auch die verschiedene Färbung, auf der Änderung der Reaktion im Stoffwechsel die

Farbenänderung mit dem Alter, sowohl im Mycel wie in den Konidien vieler „polychromer“ Arten.

Die meisten Farben werden nicht durch chemisch individualisierte Stoffe bedingt, sondern durch Gemische.

Quantitativ ist die Pigmentbildung — besonders in den Mycelien — bei verschiedenen Provenienzen in weiten Grenzen konstant verschieden; auch ein Fehlen kann daher nicht zur Aufstellung neuer Arten berechtigen.

Identifizierung spezifischer Farbstoffe ließ ähnliche Arten vielfach als verwandt erkennen, ihre Unterscheidung ließ solche trennen.

Einzelheiten und weitere allgemeine Resultate folgen demnächst. Weitere Untersuchungen stehen bevor und möchte ich mir im Gebiete der Gattung Aspergillus vorbehalten. Hierzu richte ich an alle glücklichen Finder und Besitzer von Aspergillen, besonders in tropischen und subtropischen Gebieten, die Bitte um Unterstützung durch Überlassung von etwas Trockenmaterial — möglichst mit Angaben über Standort, Fundort usw.

Berlin. Pflanzenphysiologisches Institut.

Nachdruck verboten.

Identification and Classification of Cellulose-Dissolving Bacteria.

[U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C.]

By **K. F. Kellerman, I. G. McBeth, F. M. Scales** and **N. R. Smith.**

With 2 plates.

Introduction.

The unknown series of the processes of decay in the soil by which cellulose disappears or is transformed into soil humus presumably have their inception in the fermentation or partial hydrolysis of the cellulose. In spite of the obviously fundamental relationship of cellulose decomposition to humus formation and to soil fertility, it is only recently that it has been possible to segregate and satisfactorily identify the bacteria which can be classed as cellulose ferments. The number of fermenting organisms and the number of species represented of both molds and bacteria have been found to be surprisingly large; the filamenteous fungi possessing this function apparently are more plentiful as well as more active than the bacteria. In the near future it is hoped that it may be possible to report observations now in progress upon many species of cellulose-dissolving molds. This paper, however, will deal only with bacteria which dissolve cellulose and which have been identified and studied exhaustively in pure culture.

The methods of preparing suitable culture media for investigating and identifying organisms which dissolve or ferment cellulose and the researches of other investigators have been discussed in earlier publications[1]). Some description of slight modifications in the technique of isolating and identifying pure strains of bacteria, however, as well as a brief account of our experience in this work may be useful to investigators of this group of microorganisms.

---

[1]) Kellerman, Karl F., and McBeth, I. G., The fermentation of cellulose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 485—494. 2 pl.)

McBeth, I. G., and Scales, F. M., The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. (U. S. Departm. of Agricult. Bur. of Plant Ind. Bull. 266. 1913. 50 pp. 4 pl.) [Contains review of investigations of cellulose ferments.]

Culture Media.

The investigations of the past few years have shown that among the saprophytic bacteria occurring in the soil a certain group is to be distinguished by the possession of the function of cellulose decomposition. Curiously enough, also, so far as we have been able to determine from bacteriological literature and from comparative studies of authentic strains of a large number of species of bacteria, none of the species which are now recognized as possessing the power to ferment cellulose has ever previously been described as a saprophytic species. Under these circumstances it has seemed desirable to employ only those media which are of especial importance in differentiating the species of this particular group, so far as they are known. The following varieties of culture media are important:

Cellulose broth,
Peptone cellulose broth,
Cellulose agar,
Peptone cellulose agar,
Beef agar,
Potato agar,
Starch agar,
Peptone starch agar,
Potato cylinders,
Beef gelatin,
Beef broth,
Litmus milk,
Dunhams solution,
Starch nitrate solution,
Peptone nitrite solution,
Dextrose broth,
Lactose broth,
Saccharose broth,
Maltose broth,
Glycerin broth,
Mannite broth,
Starch broth,

The preparation of most of these media is described in text books or in special articles[1]) and needs no further description here. The peptone starch agar, peptone cellulose agar, and peptone cellulose broth are similar in composition to the starch agar, cellulose agar, and cellulose broth previously described[2]), except that peptone is substituted for the inorganic nitrogenous salt in the formula. In precipitating amorphous cellulose for cellulose agar it has been found desirable to pour the Schweitzer's reagent containing the dissolved cellulose into dilute acid with continuous stirring instead of pouring the acid into the cellulose solution; the cellulose is more evenly precipitated and is therefore more satisfactory for media as well as being more readily washed.

Other important modifications of cellulose culture media have recently been described by Löhnis and Lochhead[3]), and in future investigations these media should also be employed.

For determining the ability of bacteria to reduce nitrates to nitrites and to ammonia the broth usually employed is an aqueous solution of peptone and potassium nitrate. During the course of the investigations reported in this paper it was found that many of the cellulose fermenting bacteria, when grown in Dunham's solution, formed a substance which gave the typical nitrite reaction, both with Griess' reagent and with the starchiodide solution. Since some substance which gives the typical nitrite reactions may be formed by the breaking down of the peptone molecule if bacteria are grown in Dunham's solution, it is evident that erroneous conclusions might be drawn from the results obtained with the peptone nitrate broth. Therefore a starch nitrate nutrient solution free from organic nitrogen has been used for determing nitrate reduction by the cellulose-destroying bacteria. This nitrate solution was prepared by adding half a gram of potato starch to one liter of distilled water. The starch suspension was then concentrated by boiling to about 500 c. c. This long boiling thoroughly broke up the starch grains and formed a solution of partially hydrolysed starch. Four hundred c. c. distilled water containing two grams of potassium nitrate and half a gram of sodium chloride is poured into the starch solution which is then made up to one liter, tubed and sterilized.

---

[1]) Rep. of the Committ. up. Standard Methods of the Amer. Public Health Assoc. Suppl. No. 1. 1900; Journ. of Infect. Dis.

Kellerman, Karl F., and McBeth, I. G., The fermentation of cellulose. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 485—494. 2 pl.)

McBeth, I. G., and Scales, F. M., The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. (U. S. Departm. of Agricult. Bur. of Plant Ind. Bull. 266. 1913. 50 pp. 4 pl.)

[2]) Kellerman, and McBeth, loc. cit.

McBeth, and Scales, loc. cit.

[3]) Löhnis, F., and Lochhead, G., Über Zellulose-Zersetzung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. 1913. p. 490—492.)

Technique of Isolating Pure Strains of Cellulose-Fermenting Bacteria.

If soil samples or aqueous suspensions of soil samples are used directly for making poured Petri plates with cellulose agar filamentous fungi will invariably develop and usually render difficult or impossible any selection of bacterial colonies. The development of the bacteria may be enhanced, however, and the growth of molds checked if the sample to be studied is added to sterile flasks of either plain cellulose broth or peptone cellulose broth, and when the cellulose shows signs of disintegration some days later transfers to similar sterile flasks are made, carefully avoiding any obvious development of mold during this process. Occasionally this procedure must be repeated one or more times. When this preliminary cultivation has been satisfactory, Petri plates of the opaque cellulose agar poured therefrom should show one or more colonies developing a translucent area which is due to the decomposition of the particles of cellulose imbedded in the agar. Subcultures upon cellulose agar may be made from colonies of this character and occasionally pure strains may be thus isolated. Many of the cellulose bacteria, however, develop and function vigorously in this medium only when associated with one or more foreign organisms. These contaminations may or may not be visible to the naked eye; even a microscopic examination is deceptive and frequently, indeed, the recognition of a contaminating organism becomes possible only through extended study of the culture in question upon many varieties of media. The use of starch agar instead of the cellulose agar for making subcultures has been found to be of greatest importance in facilitating the rapid isolation of pure strains of cellulose-fermenting bacteria. Poured Petri plates of starch agar are practically transparent, and the colonies of cellulose-dissolving bacteria which may appear are usually small and compact. After 5 days' incubation at 30° C., with but two exceptions, all of the cellulose-fermenting species under observation fermented the starch, so that an enzymic zone somewhat comparable to the clear area upon a cellulose Petri plate is developed. The fermented zone may be made apparent by flooding the starch agar with 95 per cent alcohol. Obviously it is then necessary to select from a duplicate Petri plate colonies of similar outline for transfer and further study.

Further subcultures upon starch agar, beef agar, or other media occasionally may be necessary to eliminate all contaminating microorganisms. It must be remembered, however, that occasionally associations of organisms are met with whose symbiosis is so close that with the present technique it is impossible to isolate the cellulose-fermenting organism in pure culture and also that many strains which actively ferment cellulose when first isolated gradually lose this function. Usually a culture may be rejuvenated to a greater or less extent by varying the culture medium, especially by substituting peptone for ammonium sulphate in the formula for cellulose agar or cellulose broth, or by transferring the organisms for a few weeks to a flask of moist sterile soil and then re-isolating upon cellulose agar.

New Species of Cellulose-Destroying Bacteria.

During the past year 13 new species of cellulose-fermenting bacteria have been isolated from a variety of soil samples from various parts of the United States. Cultures of these organisms have been kept under constant observation for 8 months in the laboratory, and it is therefore believed that the differences reported are fairly stable and inherent in the species. They will all withstand a temperature of 60° for 15 minutes, but are killed if exposed to 70° for 15 minutes. They are all rod-shaped, and none are capsulated. They grow more vigorously and ferment cellulose more rapidly under aerobic conditions, although they usually show more or less active anaerobic development also. They grow well from 20° to 37.5° C., and more rapidly at the higher temperature. Cellulose agar plates were incubated for 15 days. Starch and beef agar for 5 days. The detailed descriptions follow:

Bacillus aurogenus n. sp. See Plate I, Fig. 1.

Source. Soil from Ponchatoula, La.; and Jefferson, Me.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.4 × .4 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes.
   Beef Agar[1]). Abundant flat yellow growth in 2 days.
   Potato Agar. Very scant barely perceptible growth in 3 days.
   Peptone Starch Agar. Moderate flat, faint yellowish white in 3 days.
6. Potato cylinder. Very scant watery growth in 10 days.
7. Gelatin Stab. Liquefies gelatin slowly, from 7 to 10 days usually being required for the first appearance of liquefaction.
8. Beef broth. Turbid, small deposit sometimes shows a slight pellicle in 5 days.
9. Litmus milk. The action on milk is very slow. Five to 8 days are usually required for the reddening and from 12 to 16 days for the first appearance of curdling and digestion.
10. Plate Cultures.

---

[1]) When first isolated this organism showed only a scant faint yellow growth on beef agar; but after several months of cultivation it gives an abundant rich yellow growth in 2 days.

Cellulose Agar. Round, medium size (2—5 mm.), opaque white colony. Enzymic zone, .5 to 1.5 mm.

Peptone Starch Agar. Round, small (1.5 mm.), glistening, semi-transparent, white or grayish white colony surrounded by an enzymic zone 2 mm. in width.

Beef Agar. Surface colonies, round, small (1.5 mm.), soft, glistening, semi-transparent yellowish to white. Imbedded colonies yellow.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's scale) with: Dextrose, 1.8; Lactose, 1.4; Saccharose, 1.4; Maltose, 1.2; Glycerine, 0.7; Mannite, 0.0; Starch, 1.6.

Bacillus aurogenus var. albus n. var.

Source. Soil from Dunkirk, N. Y.

Differs from the above especially in that it is non-chromogenic.

Bacillus biazoteus n. sp.

Source. Soil from Greenville Agr. Exp. Farm, Logan, Utah.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions .8 × .5 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar strokes, 5 days.

Beef Agar. Abundant, raised, glistening, moist, smooth, whitish to lemon yellow growth.

Potato Agar. No growth.

Peptone Starch Agar. Scant, flat, glistening, colorless growth.

6. Potato cylinders, 10 days. Scant, flat, glistening, lemon-yellow growth.

7. Gelatin Stab, 10 days. Crateriform liquefaction 6—8 mm. in diameter.

8. Beef Broth, 5 days. Clouded.

9. Litmus milk. Acid in 2 days. No curdling or digestion observed in 24 days.

10. Plate cultures.

Cellulose Agar. Irregularly round, small (1—2 mm.) opaque, gray-white colony with a small white nucleus. Enzymic zone ¼ mm. or less.

Peptone Cellulose Agar. Round, medium size (3—6 mm.) semi-opaque grayish yellow colony with a lemon yellow nucleus. Usually no enzymic zone, destruction of the cellulose occurring only within the colony.

Peptone Starch Agar. Round, small (.5—2.5 mm.), opaque, yellowish gray colony with an indefinite enzymic zone .5—3 mm. in width.

Beef Agar. Round, or irregularly round, small (.5—2.5 mm.) translucent grayish yellow colonies.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; No ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Percent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 2.0; Lactose, 1.1; Saccharose, 1.0; Maltose, 0.9; Glycerine, 0.5; Mannite, 0.0; Starch, 1.5.

Bacillus caesius n. sp. See Plate I, Fig. 2.

Source. Soil from Ponchatoula, La.; Stevens, Pt., Wisc.; Westmoreland, N. H.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions $1.5 \times .4\ \mu$.
2. Flagella. 1 or 2.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes.

Beef Agar. Moderate, flat, thin, slightly bluish fluorescent at angle of 45° in 5 days.

Potato Agar. No apparent growth.

Peptone Starch Agar. Moderate, flat, moist, grayish white growth in 3 days.

6. Potato Cylinder. No growth after 24 days.

7. Gelatin Stab. Liquefaction moderate to slow crateriform, may become stratiform in old cultures.

8. Beef broth. Turbid, slight deposit in 5 days.

9. Litmus milk. Reddened after 5 days. Curdling and digestion usually does not appear until after 18 or 20 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, small (.5—1.5 mm.) opaque, white colony surrounded by a semi-transparent grayish white border. Enzymic zone .5 to 1 mm.

Peptone Starch Agar. Round, medium size (1—3 mm.) faint yellowish white colony surrounded by an enzymic zone 1.5—2 mm. in width.

Beef Agar. Surface colonies, round, small (1—2 mm.) soft glistening faint yellow. Bottom colonies bluish white or faintly fluorescent.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextose, 1.9; Lactose, 1.5; Saccharose, 1.4; Maltose, 1.1; Glycerine, 0.5; Mannite, 0.2; Starch, 1.4

Bacillus rossicus var. **castaneus** n. var. See Plate I, Fig. 3.

Source. Soil from Jefferson, Me.; Storrs, Conn.; and Geneva, N. Y.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.5 × .4 μ.
2. Flagella. 1 to 5.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the anilin dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 5 days.

Beef Agar. Abundant, irridescent.

Potato Agar. Abundant strongly irridescent.

Peptone Starch Agar. Moderate, flat, colorless.

6. Potato Cylinder. Abundant, moist, brownish growth in 10 days.

7. Gelatin stab. Spreading white surface growth, line of puncture filiform. No liquefaction.

8. Beef broth. Very turbid, heavy deposit, also pellicle in 5 days.

9. Litmus milk. Blued after 4 days. No curdling or digestion observed in 24 days.

10. Plate Culture.

Cellulose Agar. Round, medium size (2—3 mm.) opaque, white. Colony surrounded by enzymic zone .5 mm. in width.

Peptone Starch Agar. Round, large (3—5 mm.) irregular, hazy white showing no enzymic zone.

Beef Agar. Round, large (3—7 mm.), soft, grayish white colony showing a small white nucleus. Colony is sometimes surrounded by a hyaline border.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, —.3; Lactose, —.3; Saccharose, —.2; Maltose, —.3; Glycerine, —.3; Mannite, —.4; Starch, —.4.

Bacillus cellaseus n. sp.

Source. Soil from Petersboro, Utah.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.2 × .5 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 5 days.

Beef Agar. Scant, granular, whitish growth when first isolated. Upon repeated transfers, moderate, glistening, slimy, yellowish gray growth.

Potato Agar. No growth.

Peptone Starch Agar. Scant, glistening, flat, grayish growth.

6. Potato Cylinder. No growth.

7. Gelatin Stab, 10 days. Crateriform liquefaction, no liquefied gelatin present.

8. Beef broth. No growth.

9. Litmus milk. Acid in 5 days. No curdling or digestion in 24 days.

10. Plate cultures.

Cellulose Agar. Lenticular, small (major axis not over 2 mm.) opaque white colony. Enzymic zone .5 mm. or less.

Peptone Cellulose Agar. Round, medium size (1—3.5 mm.) semi-opaque grayish yellow colony with a yellow nucleus. Usually no enzymic zone, destruction of the cellulose occurring only within the colony.

Starch Agar. Surface colonies round, small (1—3 mm.), vitreous, with very small enzymic zone. Imbedded colonies round, small (.5—1 mm.) opaque gray-white, with a white nucleus. Enzymic zone .5—2 mm.

Peptone Starch Agar. Surface colonies round, small, (1—3 mm.) vitreous, with very small enzymic zone. Imbedded colonies round, small (.5 mm.) opaque gray-white, with a white nucleus. Enzymic zone as wide as 1 mm. and very indefinite.

Beef Agar. Round, small (1.5—3 mm.) vitreous colonies.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.4; Lactose, 0.4; Saccharose, 1.4; Maltose, 0.8; Glycerine, 0.3; Mannite, 1.1; Starch, 1.2.

Bacillus galbus n. sp.

Source. Soil from Ponchatoula, La.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.0 × .4 μ.

2. Flagella. 1 to 3.

3. No endospores observed.

4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 5 days.

Beef Agar[1]). Moderate, raised canary yellow.

---

[1]) When first isolated this organism showed only a faint yellow chromogenesis, but after several months on artificial media the pigment production has become very pronounced.

Potato Agar. Scant, faint, yellow growth.

Peptone Starch Agar. Moderate, flat, colorless growth.

6. Potato Cylinder. Scant yellow growth in 24 days.

7. Gelatin Stab. Liquefaction slow appearing only after 10 days as very scant crateriform.

8. Beef broth. Turbid, slight deposit in 5 days.

9. Litmus milk. Acid in 3 days, no curdling or digestion observed in 24 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Punctiform opaque, white colonies surrounded by enzymic zone .5 mm. in width.

Peptone Starch Agar. Punctiform colonies showing a very slight enzymic zone.

Beef Agar. Round, small (1 mm. or less) soft, resinous colony

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.4; Lactose, 1.3; Saccharose, 1.2; Maltose, 1.3; Glycerine, 1.2; Mannite, 0.0; Starch, 1.3.

Bacillus gelidus n. sp. See Plate I, Fig. 4.

Source. Soil from Storrs, Conn.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions $1.2 \times .4\ \mu$.

2. Flagella. 1 to 3.

3. No endospores observed.

4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 5 days.

Beef Agar[1]). Moderate, flat, gray white.

Potato Agar. Scant to moderate gray-white growth.

Peptone Starch Agar. Very scant, flat, gray white growth.

6. Potato Cylinder. No apparent growth in 10 days; potato is slightly bleached along the track of the inoculum.

7. Gelatin Stab[2]). Scant white surface growth; needle growth filiform. Liquefaction very slow or none.

8. Beef broth. Strongly turbid in 5 days.

---

[1]) When first isolated the organism grew well in beef agar, but went over into involution forms in 48 hours. These involution forms failed to grow when transferred to fresh slopes. However by making numerous transfers on this medium at intervals of 24 hours the culture was kept in good condition and the tendency to produce involution forms became less and less pronounced and finally they were no longer observed even in old cultures.

[2]) When first isolated the organism liquefied gelatin rather rapidly. The type of liquefaction being napiform after 5 days and stratiform after 15 days.

9. Litmus milk. Reddened slowly, curdled and digested in 24 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, medium size (3—5 mm.) semi-transparent grayish white colony surrounded by an enzymic zone 1 mm. in width.

Peptone Starch Agar. Round, large (15 mm.) white, opaque. Colony surrounded by an enzymic zone 1.5 mm. in width.

Beef Agar. Round, medium size (2 mm.), soft, opalescent colony.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrite solution, 10 days growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates; No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.2; Lactose, 1.2; Saccharose, 0.8; Maltose, 1.2; Glycerine, 0.4; Mannite, 0.0; Starch, 1.4.

Bacillus cytaseus var. zonalis n. var. See Plate II, figs. 5 u. 6.

Source. Compost from College Farm, Logan, Utah.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 3.2 × .5 μ.
2. Flagella. 10 to 18.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 2 days.

Beef Agar. Scant, glistening, colorless or grayish growth.

Potato Agar. Scant, glistening, colorless growth.

Peptone Starch Agar. Abundant, raised, glistening slimy growth.

6. Potato Cylinders, 10 days. Scant, flat, glistening colorless growth.

7. Gelatin stab. Very scant beaded growth along stab in 10 days.

8. Beef Broth. No growth.

9. Litmus milk. Faintly acid in 5 days. No curdling or digestion in 24 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, large (7—20 mm.). Colony consists of concentric opaque, or semi-opaque and transparent zones.

Starch Agar. Round, small (.5 mm.) opalescent colonies with a definite enzymic zone 5—8 mm. in width.

Peptone Starch Agar. Surface colonies round, large (2—9 mm.) opaque, gray-white colonies with enzymic zone 2—8 mm. in width. The imbedded colonies are small (1 mm.) but show as strong a fermentation of the starch as the surface colonies.

Beef Agar. Round or irregularly round, large (3—15 mm.) opalescent colonies, with a lobate edge.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates. No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 0.0; Lactose, 0.0; Saccharose, 0.0; Maltose, 0.0; Glycerine, 0.0; Mannite, 0.0 Starch, 0.0.

Bacillus pusilus n. sp.

Source. Soil from District of Columbia; and Port Royal, S. C.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.1 × .6 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 3 days.

Beef Agar. Moderate flat, almost colorless semi-transparent growth.

Potato Agar. No apparent growth.

Peptone Starch Agar. Very scant, flat, colorless growth.

6. Potato Cylinder. No apparent growth after 20 days, but potato is bleached along the track of the inoculum.

7. Gelatin Stab. No surface growth, liquefaction slow usually becoming infundibuliform or saccate after 15 days.

8. Beef broth. Slightly turbid in 5 days.

9. Litmus milk. Reddened slowly. No curdling or digestion after 24 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar[1]). Round, small (1—3 mm.), opaque white. Colony surrounded by an enzymic zone 1 mm. or less in width.

Peptone Starch Agar. Round, small (1—1.5 mm.), opaque grayish white colony surrounded by an enzymic zone 4 to 5 mm. in width.

Beef Agar. Round, medium size (1.5—3 mm.), soft, opaque grayish white colony.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.5; Lactose, 1.4 Saccharose, 1.6; Maltose, 1.4; Glycerine, 0.5; Mannite, 0.0; Starch, 1.5.

Bacillus subalbus n. sp.

Source. Soil from Rome, Ga.; Winchester, Ky.; and Ithaca, N. Y.

---

[1]) When first isolated this organism formed large (6—10 mm.) thin, semi-transparent colonies on cellulose agar, and the dissolution of the cellulose took place only within the colony; but after many transfers the cellulose dissolving power of the organism became much weakened and the cellulose colonies appeared as described above.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions .8 × .4 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 3 days.
   Beef Agar. Moderate, flat, white or faintly yellowish white growth.
   Potato Agar. Very scant, or no growth.
   Peptone Starch Agar. Very scant barely perceptible growth.
6. Potato Cylinder. No growth.
7. Gelatin Stab. Moderate surface growth, line of puncture filiform, no liquefaction.
8. Beef broth. Slightly turbid and small viscid deposit in 5 days.
9. Litmus milk. Slightly reddened in 4 days. Litmus rapidly reduced. No curdling or digestion occurred in 24 days.
10. Plate Cultures.
    Cellulose Agar. Round, medium size (2—4 mm.), grayish white colony showing a white nucleus and border. Sometimes semi-transparent but usually opaque. Enzymic zone 1 mm. or less.
    Peptone Starch Agar. Round, small (1 mm. or less) opaque white colony surrounded by an enzymic zone 2 to 3 mm.
    Beef Agar. Round, or irregularly round, large (3—8 mm.) viscid, opaque grayish white showing a very small white nucleus and semi-transparent grayish white border.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.
12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.
13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.
14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.6; Lactose, 1.0; Saccharose, 1.4; Maltose, 1.2; Glycerine, 0.7; Mannite, 0.2; Starch, 1.4.

Bacillus subalbus var. **batatatis** n. var.

Source. Soil from Port Royal, S. C.

Differs from the above especially in that liquefies gelatin and forms a very scant yellowish growth on potato.

Bacterium acidulum n. sp.

Source. Soil from Agr. Exp. Farm, Nephi, Utah.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.0 × .3 μ.
2. No endospores observed.
3. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

4. Agar Strokes, 10 days.

Beef Agar. Scant, vitreous along inoculum.

Potato Agar. No growth.

Peptone Starch Agar. No growth.

5. Potato Cylinders. No growth.

6. Gelatin Stab, 15 days. Very scant filiform growth.

7. Beef Broth. No growth.

8. Litmus milk. Slightly acid in 5 days. No apparent curdling or digestion in 24 days.

9. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, small (.25 mm. or less) opaque grayish white colony with enzymic zone .25 mm. or less in width. When first isolated the colonies were round, medium size, (3—4 mm.) transparent, whitish, with enzymic zone .5—1 mm. in width.

Starch Agar. No growth.

Peptone Starch Agar. No growth.

Beef Agar. Round, or lenticular, small (.5—1 mm.) vitreous colonies.

Biochemical Features.

10. Dunham's solution, 10 days' growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

11. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

12. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

13. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, .4; Lactose, .3; Saccharose, .3; Maltose, .5; Glycerine, 0.0; Mannite, 0.0; Starch, 0.0.

Bacterium udum n. sp.

Source. Compost from, Arlington, Va.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.5 × .5 μ.

2. No endospores observed.

3. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

4. Agar Strokes, 3 days.

Beef Agar. Moderate, flat, moist, glistening, gray-white growth.

Potato Agar. No apparent growth.

Peptone Starch Agar. Scant, flat, colorless growth.

5. Potato Cylinder. Scant, moist, white growth in 10 days. Potato slightly bleached.

6. Gelatin Stab. No surface growth. Liquefaction infundibuliform after 15 days.

7. Beef broth. Turbid in 5 days.

8. Litmus milk. Slightly acid after 4 days. No curdling or digestion observed even after 24 days.

9. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, small (1 mm. or less), semi-transparent bluish white with small white nucleus. Enzymic zone ½ mm. wide.

Peptone Starch Agar. Round, small (1 mm. or less) semi-transparent white colony, surrounded by an enzymic zone 2.5 mm. in width.

Beef Agar. Round, medium size (3 mm. or less), soft, opalescent or bluish white.

Biochemical Features.

10. Dunham's solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

11. Starch nitrate solution, 10 days' growth; ammonia produced; nitrite produced.

12. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

13. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1,4; Lactose, 1.3; Saccharose, 1.4; Maltose, 1.2; Glycerine, 0.0; Mannite, 0.0; Starch, 1.4.

Pseudomonas effusa n. sp. See Plate II, Fig. 7.

Source. Soils from Logan and Hyrum, Utah.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.7 × .4 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 2 days.

Beef Agar. Abundant, glistening, moist, creamy growth, slightly raised along line of inoculation and spreading over surface of medium as a white film. Medium often turned greenish fluorescent.

Potato Agar. Abundant flat, glistening, moist, rich-creamy growth, spreading over entire surface of slope.

Peptone Starch Agar. Abundant, flat, glistening moist, creamy growth. Medium greenish fluorescent.

6. Potato Cylinder, 2 days. Abundant raised, glistening, dirty or brownish, flesh-colored growth.

7. Gelatin stab, 2 days. Crateriform liquefaction, becoming stratiform above and infundibiliform below after a week. Nearly all the medium is liquefied in two weeks.

8. Beef Broth, 2 days. Heavily clouded. After 6 days there is a heavy viscid sediment and the medium is sometimes greenish-fluorescent.

9. Litmus milk. After 2 days, alkaline; medium softly coagulated, digestion beginning on top. Whey purplish curd partly decolorized. Medium is totally digested upper half of whey is purplish, lower, decolorized after 10 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, medium size (2—4 mm.) semi-opaque gray-white colony with white nucleus and rim. Enzymic zone .5 mm. or less sometimes containing a white fringe.

Starch Agar. Round, large (3.7 mm.) opaque gray-white colony with a definite enzymic zone .5—1.5 mm. in width. Sometimes large transparent colonies appear which have a very weak action on the starch.

Peptone Starch Agar. Irregular, thin, widely spreading grayish

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

colony with entire or fimbricate edge. Medium greenish fluorescent. Enzymic zone .5 mm. wide.

Beef Agar. Irregular, thin gray-white colonies spreading over entire plate. Edge fimbricate.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; no nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 2.1; Lactose, —.5; Saccharose, —.7; Maltose, 0.6; Glycerine, 0.3; Mannite, 0.2; Starch, 1.2.

Pseudomonas effusa var. **non-liquefaciens** n. var.

Source. Soil from Hyrum and North Wellsville, Utah.

Differs from Pseudomonas effusa especially in that it does not liquefy gelatin and the action on litmus milk is much slower.

Pseudomonas perlurida n. sp. See Plate II, Fig. 8.

Source. Soil from Bluemont, Va.; Ponchatoula, La.; Jefferson, Me.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1 × .4 μ.
2. Flagella. 1 to 3.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes.

Beef Agar[1]). Moderate, flat, faint yellow growth in 2 days.

Potato Agar. Very scant gray growth after 5 days.

Peptone Starch Agar. Moderate, flat, gray-white growth in 2 days.

6. Potato Cylinder. Scant yellow growth in 10 days. Potato bleached along the growth.

7. Gelatin Stab. Liquefaction slow, crateriform after 10 days. Never comes stratiform.

8. Beef broth. Slightly turbid in 5 days.

9. Litmus milk[2]). Reddened in 4 days; curdling and digestion apparent after 16 days.

10. Plate Cultures.

Cellulose Agar[3]). Round, small (1.5 mm.) opaque white. Colony surrounded by an enzymic zone .5 to 1 mm.

---

[1]) When first isolated this organism grew very poorly on beef agar requiring 3 to 5 days to make a perceptible growth; but after several months cultivation on this medium the organism makes a fair growth in two days.

[2]) When first isolated the organism acted vigorously on milk. Acid formation was apparent after 24 hours and the curdling and digestion occurred in 4 to 6 days.

[3]) When first isolated the action on cellulose was very vigorous. The colonies formed on cellulose agar were from 5 to 8 mm. in diameter and surrounded by an enzymic zone 2.5 to 3 mm. in width.

Peptone Starch Agar. Round, small (1—2 mm.) white, opaque. Some colonies show a small brown nucleus. Enzymic zone 3 to 6 mm. in width.

Beef Agar. Irregular, large (3 to 10 mm.), soft, yellowish white colonies.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; ammonia produced; no nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; no nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.8; Lactose, 1.5; Saccharose, 1.5; Maltose, 1.2; Glycerine, 0.6; Mannite, 1.5; Starch, 2.0.

Pseudomonas perlurida var. **virginiana** n. var.

Source, soil from Bluemont, Va.

Differs from the above especially in that it does not grow on potato and liquefies gelatin very rapidly.

Pseudomonas tralucida n. sp. See Plate II, Fig. 9.

Source. Soils from Nephi and Hyrum, Utah.

Morphology.

1. Vegetative cells. Average dimensions 1.2 × .6 μ.
2. Flagella. 1 or 2.
3. No endospores observed.
4. Staining reactions. Gram negative. Stains readily with the aniline dyes.

Cultural Characteristics.

5. Agar Strokes, 5 days.

Beef Agar. Moderate, flat, glistening, moist, whitish growth.

Potato Agar. Scant, flat, glistening, vitreous growth.

Peptone Starch Agar. Scant, glistening, vitreous growth.

6. Potato Cylinder. No growth.
7. Gelatin Stab, 10 days. No liquefaction, scant surface growth, filiform along stab.
8. Beef Broth. After a week, cloudy, granular sediment.
9. Litmus milk. Acid in 5 days. No curdling or digestion in 24 days.
10. Plate Cultures.

Cellulose Agar. Round, small (.5—2 mm.) semi-opaque gray-white colony with a small indefinite white nucleus. Usually there is no enzymic zone, destruction of the cellulose occurring only within the colony.

Peptone Cellulose Agar. Round, medium size (2—4 mm.) opaque gray-white colony with an enzymic zone .5—1 mm. in width. Usually there is a gray fringe in the enzymic zone.

Starch Agar. Round, small (1—4 mm.) semi-opaque, gray-white colony with enzymic zone .5—1 mm. in width.

Peptone Starch Agar. Round, small (.5—1 mm.) opaque, gray-white colony with enzymic zone 3—4 mm. in width.

Beef Agar. Round, small (.5—1.5 mm.) opalescent colonies.

Biochemical Features.

11. Dunham's solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

12. Starch nitrate solution, 10 days' growth; no ammonia produced; nitrite produced.

13. Peptone nitrite solution, 10 days' growth; no indol.

14. Fermentation of broths containing carbohydrates: No gas produced; Per cent of acidity (Fuller's Scale) with: Dextrose, 1.3; Lactose, 0.7; Saccharose, 1.6; Maltose, 1.0; Glycerine, 0.4; Mannite, 0.2; Starch, 1.6.

Summary of specific Characteristics of Cellulose-Fermenting Bacteria.

For the convenience of investigators who may wish to compare the characteristic features of the different species of cellulose-fermenting bacteria, the more important morphological and physiological details have been tabulated for all of the species known at the present time. Table I. shows the essential details of morphology and the development which can be noted macroscopically in culture media. Table II shows the biochemical reactions of the different species. A provisional key has also been prepared and it is hoped that this may be useful in the comparative study of the entire group

Table I.

Showing the Comparative Relation of the Diagnostic Features of Pure Cultures of Cellulose-Fermenting Bacteria.

	Morphology				Cultural features							
					Beef agar					Litmus milk		
	Dimensions in Microns	Number of Flagella	Spores	Involution Forms	Luxuriant Growth	Yellow Chromogenesis	Broth Clouded	Gelatin Liquefied	Growth on Potato	Acid	Alkali	Coagulated and Digested
Bacillus cytaseus[1]) . .	2.7×.5	10—18	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
„ cellaseus . . .	1.2×.5	1—3	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—
„ amylolyticus[2])	3.5×.7	10—16	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—
„ subalbus . . .	.8×.4	1—3	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—
„ pusilus . . .	1.1×.6	1—3	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—
„ rossicus[2]). . .	1.2×.3	1—5	—	+	+	—	+	+	+	—	+	—
„ biazoteus . .	.8×.5	1—3	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
„ galbus	1.0×.4	1—3	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—
„ bibulus[1]) . .	1.3×.4	1—4	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—
„ gelidus . . .	1.2×.4	1—3	—	—	+	—	+	—	+	+	—	+
„ caesius . . .	1.5×.4	1—2	—	—	—	—	+	+	—	+	—	+
„ aurogenus . .	1.4×.4	1—3	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+
Bacterium acidulum .	1.0×.3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
„ flavigenum[2])	1.0×.4	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
„ udum . . .	1.5×.5	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—
„ fimi[1]) . . .	.9×.4	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—
„ liquatum[1]) .	1.7×.4	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—
Pseudomonas subcreta[1])	1.4×.4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ tralucida	1.2×.6	1—2	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—
„ perlurida	1.0×.4	1—3	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+
„ effusa .	1.7×.4	1—6	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+

---

[1]) Described by McBeth and Scales, loc. cit.

[2]) Described by Kellerman and McBeth, loc. cit.

as well as for facilitating the identification of any of these species which investigators may isolate in the future.

Table II.

Showing Comparative Relation of Biochemical Features of Pure Cultures of Cellulose-Fermenting Bacteria.

	Dunham's Solution		Nitrate Solution		Indol	Per cent acid produced 12 days at 30° C.						
	Ammonia	Nitrite	Ammonia	Nitrite		Dextrose	Lactose	Saccharose	Maltose	Glycerine	Mannite	Starch
Bacillus cytaseus[1] . .	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0
,, cellaseus . . .	—	+	—	—	—	1.4	.4	1.4	.8	.3	1.1	1.2
,, amylolyticus[2]	—	—	—	—	—	.9	.9	.9	.8	.9	.9	1.4
,, subalbus . . .	+	+	—	+	—	1.6	1.0	1.4	1.2	.7	.2	1.4
,, pusilus . . .	+	+	—	+	—	1.5	1.4	1.6	1.4	.5	0	1.5
,, rossicus[2]. . .	+	—	—	+	—	—1.0	—1.4	—1.4	— .6	—1.4	—1.5	—1.2
,, biazoteus . .	—	+	—	+	—	2.0	1.1	1.0	.9	.5	0	1.5
,, galbus	+	+	—	—	+	1.4	1.3	1.2	1.3	1.2	0	1.3
,, bibulus[1] . .	+	+	—	—	+	1.8	1.3	1.5	1.5	.4	1.2	2.0
,, gelidus . . .	+	+	—	—	—	1.2	1.2	.8	1.2	.4	0	1.4
,, caesius . . .	+	+	+	+	—	1.9	1.5	1.4	1.1	.5	.2	1.4
,, aurogenus . .	+	+	+	+	—	1.8	1.4	1.4	1.2	.7	0	1.6
Bacterium acidulum .	—	—	—	—	—	.4	.3	.3	.5	0	0	0
,, flavigenum[2]	—	+	—	+	—	1.0	.9	.7	.9	.3	.1	1.4
,, udum . . .	—	+	+	+	—	1.4	1.3	1.4	1.2	0	0	1.4
,, fimi[1] . . .	+	+	—	+	+	1.6	.9	1.6	1.4	.8	0	1.6
,, liquatum[1] .	+	—	—	+	+	1.3	1.0	1.3	1.2	.2	0	1.4
Pseudomonas subcreta[1]	—	—	—	—	—	.6	.5	.1	.5	0	0	.6
,, tralucida	—	+	—	+	—	1.3	.7	1.6	1.0	.4	.2	1.6
,, perlurida	+	—	—	—	—	1.8	1.5	1.5	1.2	.6	1.5	2.0
,, effusa .	+	—	—	+	—	2.1	— .5	— .7	.6	.3	.2	1.2

Conclusions.

1. When the cellulose-destroying bacteria are kept under laboratory conditions for any length of time they undergo marked physiological changes which may include the loss of cellulose-destroying power.

2. The best method of isolating most of the cellulose-destroying bacteria from samples of soil, manure, or other material seems to be to add the inoculum to a filter paper nutrient solution and after a few transfers in this medium to plate successively on cellulose agar, starch agar and finally beef agar. Peptone starch agar may be used with advantage in place of regular starch agar if there are not many contaminating species present and none of the bacteria form spreading colonies.

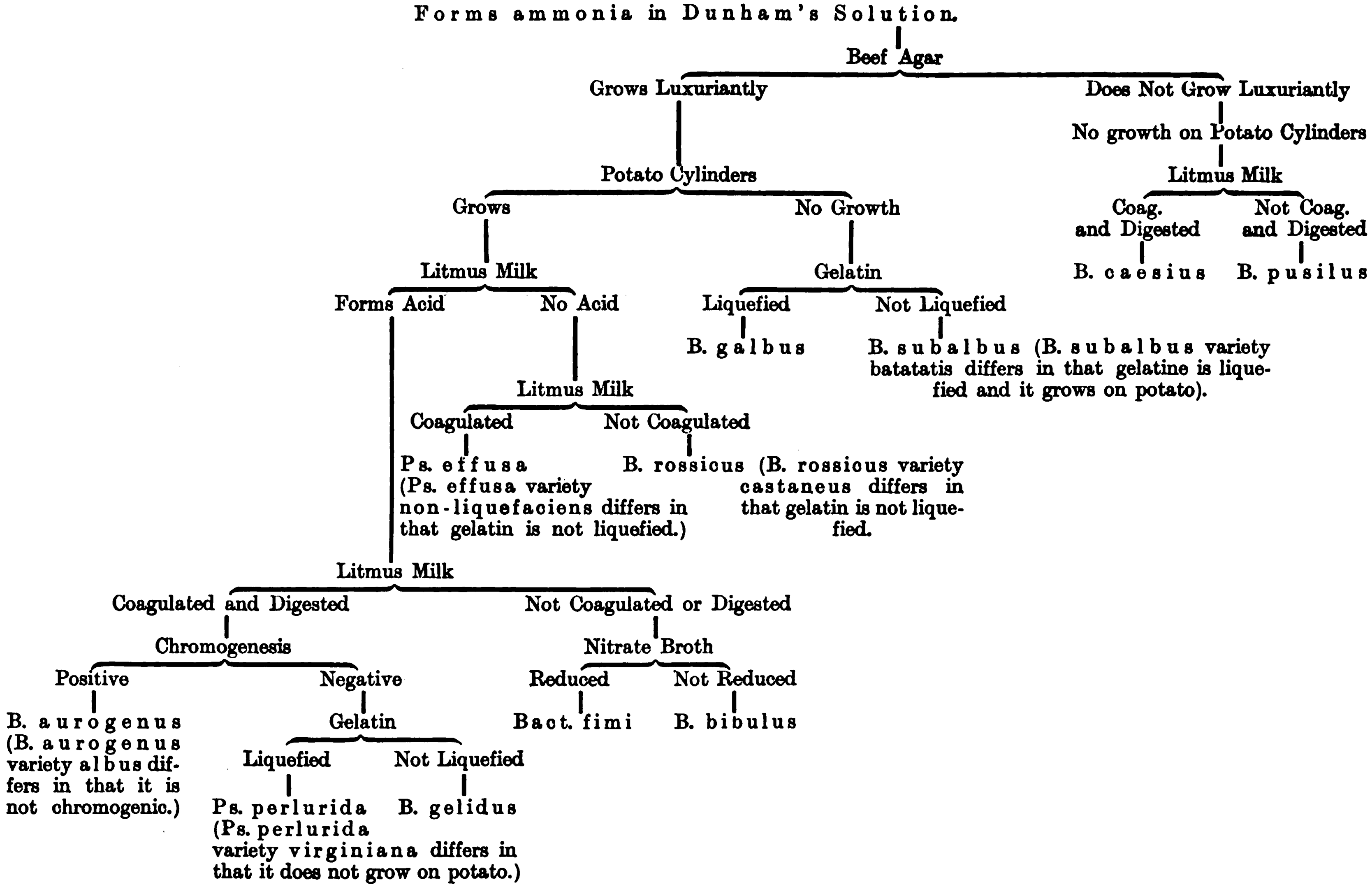
3. Many of the cellulose-destroying species give a much more vigorous growth on the various media containing organic nitrogen in the form of peptone, than on the media containing inorganic nitrogen in the form of ammonium sulphate.

---

[1] Described by McBeth and Scales, loc. cit.

[2] Described by Kellerman and McBeth, loc. cit.

Provisional Key for Identifying and Comparing Species of Bacteria which Ferment Cellulose under Aerobic Conditions. Part I.


Forms ammonia in Dunham's Solution.
Beef Agar
Grows Luxuriantly
Does Not Grow Luxuriantly
No growth on Potato Cylinders
Litmus Milk
Coag. and Digested
Not Coag. and Digested
B. caesius
B. pusilus
Potato Cylinders
Grows
No Growth
Gelatin
Liquefied
Not Liquefied
B. galbus
B. subalbus (B. subalbus variety batatatis differs in that gelatine is liquefied and it grows on potato).
Litmus Milk
Forms Acid
No Acid
Litmus Milk
Coagulated
Not Coagulated
Ps. effusa (Ps. effusa variety non-liquefaciens differs in that gelatin is not liquefied.)
B. rossious (B. rossious variety castaneus differs in that gelatin is not liquefied.
Litmus Milk
Coagulated and Digested
Not Coagulated or Digested
Chromogenesis
Positive
Negative
B. aurogenus (B. aurogenus variety albus differs in that it is not chromogenic.)
Gelatin
Liquefied
Not Liquefied
Ps. perlurida (Ps. perlurida variety virginiana differs in that it does not grow on potato.)
B. gelidus
Nitrate Broth
Reduced
Not Reduced
Bact. fimi
B. bibulus

Provisional Key for Identifying and Comparing Species of Bacteria which Ferment Cellulose under Aerobic Conditions. Part II.

Forms no ammonia in Dunham's Solution.

- Beef Agar
  - Grows Luxuriantly
    - Potato Cylinder
      - Grows
        - Acid in Litmus Milk
          - Chromogenesis
            - Positive
              - Motility
                - Positive
                  - B. biazoteus
                - Negative
                  - Bact. flavigenum
            - Negative
              - Bact. udum
      - No Growth
        - B. amylolyticus
  - Does Not Grow Luxuriantly
    - No Growth on Potato Cylinder
      - Litmus Milk
        - Acid
          - Gelatin
            - Liquefied
              - B. cellaseus
            - Not Liquefied
              - Nitrate Broth
                - Reduced
                  - Ps. tralucida
                - Not Reduced.
                  - Bact. acidulum
        - No Acid
          - Potato Agar
            - Luxuriant Growth
              - B. cytaseus
              - (B. cytaseus variety zonalis differs in that it grows upon potato, forms acid slightly in litmus milk, the cells usually are longer, and no spores have been observed.)
            - No Growth
              - Ps. suboreta

4. The organisms described in this paper grow more vigorously and destroy cellulose more rapidly under aerobic conditions, although they usually show more or less active anaerobic development.

5. Nearly all of the species grow well on the ordinary laboratory media.

6. Some cultures of cellulose-destroying bacteria produce substances in Dunham's solution which give a positive reaction for nitrites with Griess's reagent and also with the potassium-iodid-starch test.

7. A starch nitrate solution is apparently more satisfactory than the standard peptone nitrate broth for determining the reduction of NO_3 to NO_2 and to NH_3 by cellulose fermenting bacteria.

8. The eight carbohydrates tested are available to the cellulose-destroying bacteria in the following order: Cellulose, Dextrose, Maltose, Starch, Saccharose, Lactose, Glycerine and Mannite.

9. The cellulose-destroying bacteria do not form gaseous products from cellulose or from any of the carbohydrates tested in the course of this work.

10. Cellulose-destroying bacteria are widely distributed. Fifty soils from various parts of the country have been examined and each found to contain one to three species of these organisms.

Plate I.

Fig. 1. Bacillus aurogenus. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Fig. 2. Bacillus caesius. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Fig. 3. Bacillus rossicus, var. castaneus. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Fig. 4. Bacillus gelidus. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Plate II.

Fig. 5. Bacillus cytaseus var. zonalis. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Fig. 6. Bacillus cytaseus var. zonalis. Involution forms from peptone starch agar, grown 48 hours, at 28—30° C. Stained with aqueous fuchsin.

Fig. 7. Pseudomonas effusa. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Fig. 8. Pseudomonas perlurida. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Fig. 9. Pseudomonas tralucida. Vegetative cells from a culture on beef agar, grown 24 hours, at 28—30° C. Flagella stained by Dr. Hugh Williams' method. Magnification 1000 diameters.

Photomicrographs made by Mr. F. L. Goll, Scientific Assistant in Soil Bacteriology, U. S. Department of Agriculture.

Nachdruck verboten.

Bacteriological Studies of Field Soils. III.

The Effects of Barnyard Manure.

[Contribution from the Laboratory of Soil Bacteriology and Soil Chemistry,
Iowa State College, Ames, Iowa, U. S. A.]

By **Percy Edgar Brown.**

The use of farm manure to increase crop yields was common more than two thousand years ago, but the reasons for such increase remained a mystery until the brilliant researches of Liebig in the middle of the last century. He showed that certain chemical elements were essential for the growth of plants and that manure contained varying amounts of these elements. It was believed then, therefore, that the beneficial effect of manure was due to the addition of these chemical plant food constituents to the soil. Now it is commonly recognized that farm manure exerts a fourfold effect on soils; that is, not only a chemical but also a physical, a bacteriological and a physiological effect. The latter is still somewhat hypothetical and is based on the supposed toxic influence of organic substances on crops. The physical effects of manure as, for example, in opening up tight soils and rendering light, open soils more retentive of moisture and plant food, are too well known to need any discussion, as are also the chemical effects which consist mainly in adding plant food to the soil.

The bacteriological effects of manure, however, altho' receiving some attention recently in connection with the investigations in soil bacteriology, have not been extensively studied and no definite principles governing the action of manure on bacterial processes in the soil have yet been evolved. This is due to two reasons. First, the methods employed to test the bacterial activities going on in the soil have been so unsatisfactory and so constantly changing that the results obtained by their use can hardly be regarded as showing the actual extent and importance of bacterial processes in the soil nor as bringing out the differences in soils due to the effects of different treatments. In the second place, results of tests of soils kept under the artificial conditions of the greenhouse or laboratory should not be considered as more than indicative of what may be occurring under actual field conditions. As has been pointed out by various writers, the air, moisture, and general climatic conditions exert such a vital effect on the bacteria in soils that unless these conditions are natural, the results of bacterial tests can hardly be considered applicable to field soils.

The many difficulties encountered in examining field soils have been pointed out in the first work in this series, and also the means by which some of them may be eliminated or at least overcome to the extent of being negligible.

There are many questions involved in the use of manure on soils and considerable research is necessary before a definite understanding of the principles involved and the effects produced can be reached. A chemical study of the composition of soil organic matter and the organic constituents of manure are necessary and the effects of the various compounds in different manures on important groups of bacteria and on various crops must be studied. In short the problem is very complicated. It is so complicated that it would be obviously unwarranted if not absolutely ridiculous to say that the effects of manure were entirely physiological. Neither should the chemical nor the physical effects be considered of prime importance. The bacteriological changes brought about by manure are very largely dependent on its chemical and physical effects and may, therefore, be regarded as indicative of the trend of these other effects. No claim can be made, however, that the bacteriological changes are more vital than the others, but merely that they are of more significance.

In this connection it may be pointed out that the entire physical and chemical effects of manure on crop yields are not brought about directly by physical and chemical means but indirectly by definite influence on bacterial activities. Furthermore it is not too great an assumption to say that the physiological effects of manure, if there be such, are probably not caused entirely by physiological action on the plants but indirectly by physiological action on soil organisms.

It is not the purpose of these experiments, however, to undertake to solve the complicated problem of the various effects of manuring, and considerable work under a great variety of conditions will be necessary before anything approaching a solution will be possible.

This work was begun merely to throw some additional light on the bacteriological phase of the problem from the field standpoint and also to secure additional data regarding the relation between bacterial activities and actual crop yields. Earlier work on field soils and some results still unpublished indicate the existence of a definite relation between certain bacterial processes occurring in the soil and the crops produced on them and much more data is necessary in order to reach any definite conclusion. Also, as will be noted later, new methods for the bacteriological examination of soils which have recently been devised were to be tested and further evidence of their value secured.

Historical.

All the experiments which have been carried on dealing with the effects of manure on the bacteria in the soil have shown not only a considerable increase in the numbers of organisms but also in the activities of certain groups of organisms particularly important from the fertility standpoint.

The increase in actual numbers of organisms is to be expected when we remember that manure contains an enormous number of bacteria, variously estimated at from seven million to three hundred and seventy-five million per gram. Furthermore the materials present in manure which serve as bacterial food would naturally be expected to encourage the multiplication of organisms to a large extent.

Among the investigators reporting increases in numbers of organisms present in soil upon application of manure may be mentioned Caron[1]), Remy[2]), Fabricius and von Feilitzen[3]), Engberding[4]), and H. Fischer[5]).

In a more recent work Temple[6]) showed that an addition of ten tons of cow manure per acre to a soil greatly increased the number of bacteria in that soil, and that this increase continued over a considerable period. He found also that sterilized manure caused a greater increase than unsterilized. Thus it would seem that in this particular case the chemical or physical composition of the manure carried more influence than the bacterial content. Probably the manure encouraged the growth of a particular group of organisms which developed on the medium employed in the counts to such a large extent that greater numbers were obtained than was the case when the manure containing its millions of living organisms was used.

---

[1]) Vortrag, geh. in d. Wintervers. d. Zentralausschusses d. landw. Gesellsch. Hannover, d. 26. November 1896; ref. (Jahresber. d. Gärungsorg. Bd. 8. p. 212).

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. p. 734—762.

[3]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. p. 165.

[4]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 601.

[5]) Landw. Jahrb. Bd. 38. 1909. p. 358.

[6]) Bull. Georgia Agr. Expt. Stat. Vol. 95. 1911.

The possibility of the sterilization of the manure in the first case changing the chemical character of the manure, as well as the possibility of some toxic effects of the unsterilized material on the soil organisms, must also be considered.

On the other hand Hellstrom[1]) found that on moor soils fertilized with sterilized and unsterilized manure, the largest yields were obtained with the unsterilized material, and he concluded that this effect was due to the bacteria added in the manure. Unfortunately Temple did not have crop yields to compare with his bacteriological results, and Hellstrom did not determine numbers and activities of bacteria, so that we must attribute the discrepancy between the two results to the chemical and bacteriological differences in the soils and in the manure employed, which, of course, might hare been large.

Temple concluded also that additions of cow manure increased the ammonifying efficiency of most soils whether it was applied in a sterile or unsterile condition. The results of his ammonification studies, therefore, did not confirm the quantitative determinations. In the case of nitrification, however, while an increase in the nitrifying efficiency of most soils was shown, the greatest increase occurred when unsterilized manure was added. This greater effect of unsterilized manure was found to be due to the actual addition of nitrifying organisms. Niklewski[2]) determined the number of nitrite-forming organisms in two samples of manure and found about 32,000 present per gram.

Wohltmann, Fischer and Schneider[3]) and Moll[4]) showed that peptone decomposition, nitrification, ammonia assimilation, and nitrogen fixation in soil were more or less strongly increased by additions of manure. Considerable increase in the peptone decomposing power of soil with applications of manure, was likewise shown by Lipman[5]). Welbel[6]) noted increased nitrate formation in soils receiving manure, and Wollny[7]) showed a large increase in carbon dioxide production attributable, of course, to the large amount of organic material introduced and to the bacterial activities encouraged thereby.

It will not be necessary to cite the literature bearing on the subject of denitrification and nitrogen fixation as affected by manure, as the present experiments do not include work along those lines. Suffice it to say that nitrogen fixation has been shown to be increased when manure was applied to soils, and denitrification also. In the latter case, however, from the methods employed in making the tests, the results are very questionable and it is commonly believed now that unless excessive amounts of manure are applied together with a nitrate fertilizer there is little or no danger of volatilization of nitrogen by denitrification.

The plots employed.

Five one-tenth acre plots which have been under experiment for five years were chosen for this work. The plots are located on the Wisconsin drift area, the particular soil type being a Marshall loam, and they are quite uniformly level. Prior to 1908 the land had been used for ordinary farming rotations and had received no special treatment. In 1908 a system of cropping according to the regular four year rotation of corn, corn, oats and clover was begun with a crop of corn. This was followed by oats in 1909 and this in turn by clover in 1910. In the fall of 1910 manure was applied as follows:

Plot No.		Treatment.
1004	—	Check
1005	—	8 tons manure per acre.
1006	—	12 „ „ „ „

---

[1]) K. Dan. Akad. Handl. Bd. 33. 1899. p. 167—171.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. p. 414.

[3]) Journ. f. Landw. Bd. 52. 1904. p. 97—125.

[4]) Beitr. z. Biochem. d. Bodens. [Diss.] Leipzig 1909. p. 45—54.

[5]) Rpt. New Jersey Agric. Expt. Stat. Vol. 27. 1906. p. 135.

[6]) Russ. Journ. f. Expt. Landw. Bd. 4. 1903. p. 307; Bd. 6. 1905. p. 163.

[7]) Landw. Vers.-Stat. 36. 1899. p. 211.

Plot. No.		Treatment.
1007	—	16 tons manure per acre.
1008	—	20 „ „ „ „

In the following year the corn crop suffered very severely from a continued drought and that on the plots receiving the manure more so than on the check plot. Evidently the manure exerted a depressing effect on the crop yields, due to the dry weather.

In 1912, however, a good season brought the yield of the second corn crop up to the normal and the beneficial effects of the manure became apparent.

The crop yields will be given later and comparisons between these and the bacteriological activities in the various plots will be made. The tests of the bacteriological activities include determinations of the number of organisms in the soils and of the ammonifying and nitrifying powers of the soils, several methods being used in these determinations.

Four samplings were made, the first on August 2, the second on August 15, the third on August 22, and the last on September 9. The results obtained at the different dates are quite satisfactory and in most cases the same differences between the various soils are evidenced.

The method of sampling.

The method of sampling employed in this work was the same as has been given in the previous reports of the study of field soils[1]) and need not be described again here. The method continues to prove satisfactory and to justify the claims which have been made for it. It may be noted in this connection that samples are never drawn immediately following a rain or during a severe drought, as the conditions in the soil are then deemed to be too abnormal to permit of representative results. Several days should elapse before samples are drawn when a heavy precipitation has occurred in order to permit the soil to return to its normal moisture content, and many of the organisms which have been washed down into the lower soil layers to return to the surface via the capillary moisture. As is known, there is considerable depression in numbers of organisms in a soil after a continued drought and species relationships are considerably altered. It is but natural then to expect that the differences in bacterial conditions in various plots may be very largely obscured by the death or inactivity of important species, and considerable care should be exercised also in thoroughly mixing the soil in the area from which the samples are drawn in order to secure as complete uniformity as possible.

The quantitative determinations.

Iu the quantitative determinations two media were employed, the first being the „modified synthetic“ agar used in the previous work in this series of studies of field soils, and the second an albumen agar which was devised by the writer and is described in a recent publication[2]). Comparisons of these two media were given in the publication just referred to and the purpose of using them both in this experiment was to afford additional data regarding the value of the albumen agar which according to the previous results allowed of the development of much larger numbers of organisms than the modified synthetic agar.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 35. 1912. p. 234; Bd. 35. 1912. p. 248.
[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 38. 1913. p. 497.

The composition of the albumen agar is as follows:

1000 cc. distilled water
0.5 gm. K_2HPO_4
0.2 gm. $MgSO_4$
0.1 gm. Egg. Albumen
10.0 gms. dextrose
trace $Fe_2(SO_4)_3$
15.0 gms. agar.

The only difference between this medium and the modified synthetic agar is that in the latter the albumen is replaced by 0.05 gm peptone.

The usual method of making the plates was employed; that is, 100 gms of soil were shaken for five minutes with 200 cc. of sterile water and dilutions made of 1—2,000; 1—20,000, and 1—200,000. Two 1 cc. portions of each of these dilutions were plated, one with modified synthetic agar and the other with albumen agar. The plates were incubated for three days at room temperature at the first date, for four days at the second, and for five days at the third and fourth dates, at the same temperature.

The results of these quantitative determinations are given in tables I and II and are calculated as usual as numbers of bacteria per gram of air-dry soil. The moisture content of the soils at the different samplings is given in Table III. Glancing over this table we find very little variation in the moisture conditions in the various soils at the different dates, the largest difference at any one date being only two and one half per cent.

The moisture conditions being so nearly uniform, the differences in bacterial numbers and activities in the various plots, as brought out by these experiments, must be attributed, therefore, to differences inherent in the soil or brought about by different treatments. Differences inherent in the soil may be very largely neglected in this case, however, as the soil is uniform in composition and the plots are located on level, well-drained land. Hence differences in treatment must be regarded as the cause of varying bacterial activities.

Table I.
Quantitative determinations.
(Modified synthetic agar.)
(Bacteria per gram of air-dry soil.)

Plot. No.	Aug. 2.	Aug. 15.	Aug. 22.	Sept. 9.
1004	2,800,000	1,700,000	2,150,000	2,125,000
1005	3,143,000	2,750,000	3,031,000	2,950,000
1006	3,331,000	3,726,000	3,400,000	3,248,000
1007	3,462,000	3,713,000	3,500,000	3,151,000
1008	3,223,000	3,204,000	3,180,000	3,024,000

Turning to Table I which gives the quantitative results with modified synthetic agar, we note that at every sampling the plots receiving 8 tons of manure per acre showed greater numbers than the check plot, and the plot receiving 12 tons gave a still larger number. At two dates the maximum number of organisms seems to have been reached with this latter amount of manure and a slight depression occurred with 16 tons, but at the other two samplings a slight increase was obtained with the larger amount of manure.

Any conclusion regarding the amount of manure causing the maximum increase in numbers of organisms would, therefore, hardly be justifiable. The plot receiving 20 tons of manure per acre in every case showed fewer bacteria than those receiving 16 and 12 tons per acre, but more than that receiving 8 tons per acre. If still larger amounts of manure has been employed it is a matter of doubt whether a further depression in numbers would have occurred — even perhaps below the check plot.

When we examine Table II. which gives the results obtained by the use of the albumen agar we find that much larger numbers are shown. The difference in the incubation period of the plates at different dates which has been mentioned was hardly apparent when the modified synthetic agar was used. The maximum counts were evidently obtained in three days. With the albumen agar on the other hand the best results were secured in 4—5 days, which allowed time for the development of many colonies which in three days were probably too small to be visible. Greater differences in the numbers from the different plots were also shown where the longer incubation periods were employed.

Table II.

Quantitative determinations.

(Albumen agar.)

(Bacteria per gram of air-dry soil.)

Plot No.	Aug. 2.	Aug. 15.	Aug. 22.	Sept. 9.
1004	3,153,000	6,500,000	4,550,000	2,875,000
1005	3,565,000	7,550,000	5,153,000	3,750,000
1006	3,894,000	9,496,000	6,500,000	4,315,000
1007	4,046,000	9,501,000	6,450,000	4,121,000
1008	3,741,000	8,932,000	5,693,000	3,951,000

Table III.

Moisture in soils.

Plot No.	Aug. 2. per cent	Aug. 15. per cent	Aug. 22. per cent	Sept. 9. per cent
1004	15.00	20.00	20.00	20.00
1005	14.75	20.00	19.50	20.00
1006	14.75	19.50	20.00	17.50
1007	14.50	19.75	20.00	17.50
1008	15.00	19.50	19.50	18.00

Practically the same relations were observed here as were noted with the modified synthetic agar. The plot receiving 8 tons of manure per acre showed larger numbers than the check plot and that receiving 12 tons per acre still larger numbers. Again the plot to which 16 tons per acre were applied, at two dates showed slightly greater numbers and at the other two samplings slightly fewer organisms, the differences being very small. Where 20 tons of manure per acre were applied, just as with the other medium fewer organisms were shown than where 12 tons were used, but more than where 8 tons were added.

The effects of the application of manure, therefore, up to a certain amount seemed to be to cause an increase in numbers of organisms developing on the modified synthetic and albumen agars. Beyond this maximum amount which was apparently about sixteen tons per acre, there occurred a distinct decrease in numbers of organisms, fewer bacteria being found than in the soil receiving the 12 tons per acre.

The variation in the results at the different dates on the soils receiving the sixteen tons of manure make it impossible to fix the point at which the maximum effects from the manure were produced.

As has been noted already, it was not the intention in this work to examine into the causes for the results secured, consequently the reasons for the increase in organisms with applications of manure up to about 16 tons per acre followed by a decrease when 20 tons were used may be merely suggested. The increase without doubt may be attributed primarily to the addition of large numbers of organisms, to the addition of a large amount of bacterial food and to the presenting of more favorable physical conditions for the multiplication of the organisms present in the soil as well as those introduced.

The depression in numbers of organisms when 20 tons of manure per acre were applied may be due to one of two causes, either to the effect of the organic matter in the manure on the groups of organisms which develop on the modified synthetic and albumen agars, or to the fact that encouragement was given to groups of bacteria which do not develop on these media to such an extent that the other groups were restricted and this depression of course appeared in the counts while the gains in the other groups could not be determined. It would be interesting to continue this work using larger amounts of manure and to ascertain how far this depression in numbers would go.

Comparing the results obtained in using the two media we find that greater numbers were obtained in every case with the albumen agar, the greatest difference being apparent when the incubation period was four days which was apparently the optimum incubation period for albumen agar. Furthermore, greater differences between the numbers of organisms in the different plots were given by the counts on the albumen agar than by those on the modified synthetic agar. There are, therefore, undoubtedly organisms which develop on the albumen agar which refuse to do so on the synthetic agar. The advantages which were attributed to the albumen agar in the work already cited were therefore borne out by these results. The one objection to the medium which was mentioned in the same work may be noted here as being of little importance. This objection was the cloudiness of the medium, brought about by the coagulation of the albumen when the medium was sterilized. By shaking the tubes of agar thoroughly before plating, the coagulum was broken up quite completely and gave no difficulty in the counting as the colonies were readily distinguishable from the minute particles of coagulum.

The ammonification experiments.

In the experiments to determine the ammonifying power of the soils four methods were used. These methods have been described in a recent publication[1]), and they were employed in this series to obtain additional evidence of their value. Casein, which was advocated in the work just referred to as being the most satisfactory material to be used as a measure of the ammonifying power of soils, and albumen, which also gave evidence of some value, were employed with fresh soil as a medium. The results obtained by the use of these substances were compared with those secured using dried blood with fresh soil and dried blood with air-dried soil inoculated with infusions of fresh soils.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 39. 1913. p. 61.

Six one hundred gram portions of fresh soil obtained as already described were weighed out in tumblers and thoroughly stirred by means of a sterile spatula. To two of these portions 10 cc. of a casein solution prepared by dissolving 100 grams of casein in 1000 cc. of water containing 70 cc. of normal NaOH were added. To the second two 10 cc. of a 10 per cent solution of albumen prepared by dissolving sterile albumen in sterile water were applied. To the remaining two five grams of dried blood were added and thoroughly mixed with the soil. The moisture content of the fresh soil was determined and sterile water was added to the samples to bring them up to the optimum for the soil, 70 per cent being considered the optimum for the dried blood. They were then covered and incubated for varying lengths of time.

Samples of soil from the various plots were air-dried and sieved and two 100 gram portions of each were weighed out in tumblers. Five grams of dried blood were added to each and thoroughly stirred in and 20 cc. of infusions of fresh soils obtained at the same time as those used in the other methods and prepared by shaking 100 grams for five minutes with 200 cc. of sterile water were added. The moisture content here was adjusted to the optimum with sterile water, 70 per cent being again taken as the optimum for the dried blood. These samples were also covered and incubated at room temperature.

The distillation of all of these samples was carried on as usual, transferring to copper flasks, adding water, heavy magnesium oxide and a little paraffin, collecting the ammonia in standard acid and titrating against standard alkali.

The results obtained when using the casein are given in Table IV and the summarized results in Table V. At the first date of sampling the incubation period was only three days, while at the latter three dates it was four days and consequently larger amounts of ammonia were produced in the latter cases.

Table IV.
The ammonification of casein.

Plot No.	Lab. No.	Aug. 2 mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	Aug. 15 mgs. N.	Average mgs. N.
1004	41	38.46		541	67.10	
	42	37.28	37.87	542	69.45	68.27
1005	43	46.70		543	72.99	
	44	47.09	46.89	544	74.16	73.57
1006	45	51.40		545	76.91	
	46	52.19	51.79	546	78.09	77.50
1007	47	51.01		547	78.09	
	48	52.97	51.99	548	78.87	78.48
1008	49	48.78		549	74.56	
	50	48.78	48.78	550	75.73	75.14

The ammonification of casein (cont.).

Plot No.	Lab. No.	Aug. 22 mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	Sept. 9 mgs. N.	Average mgs. N.
1004	1041	67.10		1241	52.58	
	1042	67.89	67.49	1242	50.62	51.60
1005	1043	73.38		1243	59.25	
	1044	72.20	72.79	1244	58.47	58.86
1006	1045	78.48		1245	66.32	
	1046	79.26	78.87	1246	66.32	66.32
1007	1047	79.26		1247	65.92	
	1048	79.66	79.46	1248	65.53	65.72
1008	1049	74.16		1249	60.03	
	1050	75.34	74.75	1250	60.82	60.42

Table V.
The ammonification of casein.

Plot No.	I. mgs. N.	II. mgs. N.	III. mgs. N.	IV. mgs. N.
1004	37.87	68.27	67.49	51.60
1005	46.89	73.57	72.79	58.86
1006	51.79	77.50	78.87	66.32
1007	51.99	78.48	79.46	65.72
1008	48.78	75.14	74.75	60.42

The main fact to be obtained from Table IV is that the duplicate determinations agree remarkably well, in most cases the agreement being as close as could be expected in a chemical method. As will be noted later, this is a great advantage for the casein method.

Turning to Table V for a summarization of the results we find that the soils receiving applications of manure all showed greater ammonifying power than the check soil. The plot receiving 12 tons of manure per acre showed a higher ammonifying power than that receiving 8 tons. The soil to which 16 tons of manure per acre were applied, except in one case when a slight decrease occurred, gave a slightly greater production of ammonia than that where 12 tons per acre were used. The application of 20 tons of manure per acre, however, decreased the ammonifying power of the soil below that given by the soil receiving 12 tons per acre, but it remained somewhat greater than that of the plot where 8 tons were added. The large amount of manure in this latter case evidently depressed the activities of the ammonia producing organisms. This depression was coincident with a depression in number of organisms and hence indicates that the media employed for counting the numbers of organisms permit of the development of the ammonifying species. The largest ammonia production occurring thus in the soil receiving 16 tons of manure per acre, it is probably a safe assumption therefore that the maximum ammonification would occur on this particular soil type with application of manure somewhere about 16 tons per acre.

Table VI contains the results using albumen as the measure of the ammonia producing power of the soil. The samples at the first date were incubated only four days while at the later samplings six days was the length of incubation. Hence the ammonia production at the first date was very much less than at the later samplings and the differences between the various soils were smaller. Six days seemed to be the optimum period of incubation. The duplicate determinations agreed quite closely, in only one or two cases were there discrepancies of any size.

Table VI.

The ammonification of albumen.

Plot No.	I. Lab. No.	I. Ammonia mgs. N.	I. Average mgs. N.	II. Lab. No.	II. Ammonia mgs. N.	II. Average mgs. N.
1004	61	17.27		561	53.76	
	62	17.27	17.27	562	54.15	53.95
1005	63	23.15		563	57.68	
	64	23.94	23.54	564	56.90	57.29
1006	65	26.29		565	62.78	
	66	27.08	26.68	566	64.35	63.56
1007	67	27.08		567	65.53	
	68	27.47	27.27	568	64.75	65.14
1008	69	23.94		569	58.86	
	70	24.72	24.33	570	60.43	59.64

The ammonification of albumen (cont.).

Plot No.	III. Lab. No.	III. Ammonia mgs. N.	III. Average mgs. N.	IV. Lab. No.	IV. Ammonia mgs. N.	IV. Average mgs. N.
1004	1061	57.68		1261	54.15	
	1062	54.15	55.91	1262	52.97	53.56
1005	1063	62.00		1263	57.68	
	1064	62.00	62.00	1264	58.47	58.07
1006	1065	67.89		1265	70.24	
	1066	69.85	68.87	1266	68.67	69.45
1007	1067	67.89		1267	69.45	
	1068	70.24	69.06	1268	71.02	70.23
1008	1069	64.35		1269	67.49	
	1070	62.78	63.56	1270	69.06	68.28

Table VII.

The ammonification of albumen.

Plot No.	I. Ammonia mgs. N.	II. Ammonia mgs. N.	III. Ammonia mgs. N.	IV. Ammonia mgs. N.
1004	17.27	53.95	55.91	53.56
1005	23.54	57.29	62.00	58.07
1006	26.68	63.56	68.87	69.45
1007	27.27	65.14	69.06	70.23
1008	24.33	59.64	63.56	68.28

Turning to Table VII which gives the summarized results with albumen we note that the increased ammonifying power produced in the soil by addition of manure was again evidenced. Again the application of 12 tons per acre caused a larger increase than 8 tons. Sixteen tons in every case here caused a slightly greater production of ammonia than 12 tons. The conclusion reached from the results obtained with casein are therefore confirmed; that is, it seems that manure applied to soil at the rate of about 16 tons per acre caused the maximum ammonia production.

The larger amount of manure (20 tons) just as in the previous case reduced the ammonia production below that from the soils receiving 12 and 16 tons but it still remained larger than that from the soil receiving 8 tons per acre.

These results again coincided very largely with the results of the quantitative determinations and further evidence was thus supplied that the media employed in the latter determinations permit of the development of the ammonia producing organisms to a very large extent.

The results obtained by the use of dried blood in fresh soil are given in Table VIII and the summarized results in Table IX. These samples were incubated for five days, which has been found to be the optimum period for the ammonification of dried blood.

Table VIII.
The ammonification of dried blood.
(Fresh soil.)

Plot No.	Lab. No.	I. Ammonia mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	II. Ammonia mgs. N.	Average mgs. N.
1004	21	68.28		521	85.94	
	22	65.53	66.90	522	82.01	83.97
1005	23	86.72		523	94.18	
	24	82.80	84.76	524	90.25	92.21
1006	25	90.64		525	102.81	
	26	82.01	86.32	526	109.87	106.34
1007	27	100.06		527	107.91	
	28	95.75	97.90	528	111.05	109.47
1008	29	87.90		529	101.24	
	30	85.54	86.72	530	90.25	95.74

Plot No.	Lab. No.	III. Ammonia mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	IV. Ammonia mgs. N.	Average mgs. N.
1004	1021	74.95		1221	67.10	
	1022	72.20	73.57	1222	66.32	66.71
1005	1023	85.94		1223	71.42	
	1024	82.01	83.97	1224	69.85	70.63
1006	1025	96.53		1225	84.76	
	1026	101.24	98.88	1226	86.32	85.54
1007	1027	95.35		1227	86.32	
	1028	102.42	98.88	1228	83.58	84.95
1008	1029	89.07		1229	78.48	
	1030	85.94	87.50	1230	75.34	76.91

The duplicate determinations here, as is always the case when dried blood is employed, did not agree very closely. There is such a large amount of ammonia produced, it is so difficult, to mix the dried blood thoroughly with the soil and the difficulty in distilling because of foaming is so great that close agreement of duplicates is always impossible. Examining the summarized results in Table IX we find that the effects of the manure on the ammonia production were quite pronounced.

Table IX.
The ammonification of dried blood.
(Fresh soil.)

Plot No.	I. Ammonia mgs. N.	II. Ammonia mgs. N.	III. Ammonia mgs. N.	IV. Ammonia mgs. N.
1004	66.90	83.97	73.57	66.71
1005	84.76	92.21	83.97	70.63
1006	86.32	106.34	98.88	85.54
1007	97.90	109.47	98.88	84.95
1008	86.72	95.74	87.50	76.91

The soil receiving 12 tons of manure per acre showed greater ammonifying power than that receiving 8 tons, which in turn gave a greater ammonia production than the check soil.

Table X.
The ammonification of dried blood.
(Air-dry soil.)

Plot No.	I. Lab. No.	I. Ammonia mgs. N.	I. Average mgs. N.	II. Lab. No.	II. Ammonia mgs. N.	II. Average mgs. N.	III. Lab. No.	III. Ammonia mgs. N.	III. Average mgs. N.	IV. Lab. No.	IV. Ammonia mgs. N.	IV. Average mgs. N.
1004	1	72.59		501	113.80		1001	113.01		1201	114.19	
	2	88.29	80.44	502	109.87	111.83	1002	99.67	106.34	1202	91.43	102.81
1005	3	96.14		503	113.80		1003	105.16		1203	114.97	
	4	93.39	94.76	504	120.86	117.33	1004	113.79	109.47	1204	119.29	117.13
1006	5	102.02		505	127.92		1005	129.10		1205	133.81	
	6	98.10	100.06	506	134.59	131.25	1006	115.37	122.23	1206	122.04	127.92
1007	7	104.38		507	153.43		1007	129.10		1207	137.34	
	8	97.32	100.85	508	120.86	137.14	1008	118.90	124.00	1208	128.71	133.02
1008	9	97.32		509	118.11		1009	116.94		1209	121.64	
	10	94.18	95.75	510	139.69	128.90	1010	110.66	113.80	1210	123.61	122.62

Where 16 tons per acre were applied, at two dates there was shown a still greater ammonifying power, and at the other two samplings practically identical figures were obtained as where 12 tons were used. We may conclude again therefore that applications of about 16 tons of manure per acre bring the soil to its maximum ammonifying power.

The 20 ton application, however, just as was the case when the casein and albumen were used, depressed the ammonifying power of the soil below that of the soils receiving 12 and 16 tons per acre, but hardly down to that of the soil to which 8 tons were applied.

The results secured by this method confirm very largely those secured in the other cases and therefore the same agreement with the results of the quantitative determinations is to be noted.

Examining Table X for the results secured by using air-dried soil with dried blood and inoculations of fresh infusions we find that the agreement between the duplicate determinations was very poor altho' the averages give us about the same differences between the various soils as were shown by the other methods. These differences in duplicates by this method are unavoidable for the reasons which have been discussed.

These samples were all incubated for six days, which has been shown to be the optimum period for dried blood in air-dry soil.

In Table XI the average results show the ammonifying power of the different soils by this method. The application of 8 tons of manure per acre caused a decided increase in the ammonifying power of the soil, 12 tons, a greater increase, and 16 tons a still further increase, which however, at two dates was very slight. The 20 tons again depressed the ammonifying power of the soil below that shown where 12 and 16 tons were employed but not below that where 8 tons were applied.

These results coincided very satisfactorily with those secured by the other methods.

Table XI.

The ammonification of dried blood.

(Air-dry soil.)

Plot No.	I. Ammonia mgs. N.	II. Ammonia mgs. N.	III. Ammonia mgs. N.	IV. Ammonia mgs. N.
1004	80.44	111.83	106.34	102.81
1005	94.76	117.33	109.47	117.13
1006	100.06	131.25	122.23	127.92
1007	100.85	137.14	124.00	133.02
1008	95.75	128.90	113.80	122.62

Again, the effect of applications of manure in increasing the ammonifying power of the soil is clearly shown, the maximum amount of ammonia being produced when about 16 tons of manure per acre were used. Beyond 16 tons there occurred a depression in ammonifying power similar to that shown by the other methods. Again the results corresponded closely with the results of the quantitative determinations.

Considering these ammonification results as a whole several facts should be emphasized. In the first place the effect of applications of barnyard manure on the ammonifying power of the soil was quite definitely shown. The increases secured were too great to be accounted for merely on the basis of the plant food actually added in the manure. Of course the physical factors are of some importance but in this case greater effects have been noted than could be ascribed to them.

It seems, therefore, from these results that the effects of manure may be very largely due to the influence on the bacterial activities. Whether this influence is due to the chemical, physical, or bacteriological composition of the manure or to its physiological effect on bacteria in stimulating their growth cannot be stated, but it is undoubtedly the case that the effect on crop growth may be traced directly to the effect on certain bacterial activities. The ammonifying power of a soil representing as it does the production of available nitrogenous material for plant growth must therefore be linked up closely with crop production. That is, unless conditions are exceedingly abnormal in a soil, we may assume that the activities of the ammonifying organisms are indicative of the crop-producing power of the soil.

In the earlier work in this series of studies of field soils, the actual crops produced and the ammonifying power of the soils as measured in the laboratory have been found to be very closely correlated. The crop yields from the plots used in these experiments will be given later and their correspondence with these ammonification results noted.

In the second place evidence is supplied that numbers of bacteria and ammonification are very closely related. This is in accord with the results already secured and is of much interest from the fertility standpoint. As has just been stated, we know that its ammonifying power may be a very close measure of the fertility or crop-producing power of a soil. The numbers of organisms found by the use of the albumen and modified synthetic agars varied in the different soils exactly as the ammonifying power of the soils varied and hence we may conclude that the estimate of the numbers of bacteria in the soils included at least the major portion of the ammonifying species, and furthermore, that a definite relation between numbers and crop production may be traced.

Finally the fact that too heavy applications of manure may be made to a soil was quite definitely shown. When more than 16 tons of manure per acre were used a depression in the ammonifying power of the soil occurred corresponding to a decrease in numbers.

It is evident therefore that too much manure may be positively injurious. It will be shown later that the crop yields were also reduced by the large amount of manure.

Comparing the results secured by the various methods for the study of ammonification, previous conclusions were borne out by the figures at hand.

The most satisfactory method was again found to be the fresh soil-casein method. The differences were more pronounced by this method, the duplicates agreed the best and the least difficulty in distilling was encountered. When albumen was used the main difficulty appeared in the preparation of a sterile solution. This was so difficult that in view of the fact that the albumen possesses no advantage over the casein, the method cannot be recommended. When the fresh soil-dried blood method was used, the amounts of ammonia produced were so large and so much carbon dioxide was formed that there was great difficulty in distilling. This fact together with the difficulty in mixing the dried blood thoroughly with the soil may be held accountable for the poor agreement of duplicates. When the dried blood was used with air-dry soil the same difficulties were experienced, and an additional objection to the method lies in the fact that air-dry soil is not sterile and soil infusions may not be absolutely representative, and hence the results secured by the method cannot be depended upon as representing field conditions.

In short, the casein method according to these results, possessed many advantages over the other methods and previous claims made for it are entirely supported.

The nitrification experiments.

The nitrification experiments were carried out using ammonium sulfate with fresh soil and with air-dry soil. The use of fresh soil has seemed by far the most rational to be used in examining soils, and it was desired to compare the results secured by its use with those obtained with air-dry soil.

One hundred gram quantities of fresh soils were weighed off in tumblers, stirred thoroughly and 1 cc. portions of a 10 per cent solution of ammonium sulfate added.

The moisture content of the soils was ascertained and then brought up to the optimum with sterile water. The tumblers were covered and incubated for four weeks, the water content being kept constant by making up to weight with sterile water every week.

Table XII.
The nitrification of $(NH_4)_2 SO_4$.
(Fresh soil.)

Plot No.	Lab. No.	I. Aug. 2 mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	II. Aug. 15 mgs. N.	Average mgs. N.
1004	141	5.000		641	11.000	
	142	6.152	5.576	642	10.892	10.946
1005	143	7.156		643	12.500	
	144	7.362	7.259	644	12.667	12.583
1006	145	8.379		645	16.665	
	146	8.561	8.470	646	16.802	16.733
1007	147	10.164		647	18.500	
	148	10.400	10.282	648	18.888	18.694
1008	149	8.052		649	16.000	
	150	8.199	8.125	650	16.328	16.164

Plot No.	Lab. No.	III. Aug. 22 mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	IV. Sept. 9 mgs. N.	Average mgs. N.
1004	1141	10.000		1341	9.282	
	1142	10.567	10.283	1342	9.000	9.141
1005	1143	12.359		1343	10.000	
	1144	12.728	12.543	1344	10.000	10.000
1006	1145	14.285		1345	12.500	
	1146	14.000	14.142	1346	12.896	12.698
1007	1147	15.282		1347	12.800	
	1148	16.000	15.641	1348	13.222	13.011
1008	1149	13.000		1349	10.228	
	1150	12.899	12.949	1350	10.829	10.528

At the same time one hundred gram quantities of air-dry sieved soil from the various plots were weighed off, 1 cc. portions of a 10 per cent ammonium sulfate solution added, and 20 cc. of five minute infusions of fresh samples of the corresponding soils were introduced. The moisture content was adjusted and maintained during the incubation period of four weeks as in the other method.

The results of the tests with fresh soils are given in Table XII. The duplicate determinations agreed very satisfactorily and we may turn to Table XIII which gives the summarized results.

Table XIII.
The nitrification of $(NH_4)_2SO_4$.
(Fresh soil.)

Plot No.	I. mgs. N.	II. mgs. N.	III. mgs. N.	IV. mgs. N.
1004	5.576	10.946	10.283	9.141
1005	7.259	12.583	12.543	10.000
1006	8.470	16.733	14.142	12.698
1007	10.282	18.694	15.641	13.011
1008	8.125	16.164	12.949	10.528

In every case the manure increased the nitrifying power of the soil up to 16 tons per acre. Beyond that, however, a reduction occurred, 20 tons depressing the nitrate production below that shown by the soil receiving 12 tons per acre. The results were quite in agreement with those secured in the quantitative determinations and ammonification experiments except that in those cases the maximum amount of manure was not so definitely shown.

Here the greatest nitrifying power in every case appeared in the soil receiving 16 tons of manure per acre.

The results by the use of air-dry soil are given in Table XIV and here too the duplicates were quite satisfactory. In Table XV the summarized results of the tests appear and upon examination we find that differences in the nitrifying power of the soil were, obtained here similar to those secured by the use of fresh soil. Again the application of manure up to 16 tons per acre increased the nitrifying power of the soils, 12 tons giving a larger nitrate production than 8 tons, and 16 tons more than 12. There was one exception to this increase, however, at the last date of sampling a slightly smaller nitrate production was noted in the plot receiving 16 tons of manure than in that to which 12 tons were applied. The difference was so slight that it would be negligible were it not for the fact that the same slight decrease occurred at this date in the numbers of organisms and in the ammonifying power measured by casein or by dried blood in fresh soil, in the soil receiving 16 tons over that to which 12 tons per acre were added. It might seem therefore that at that particular date, or in the particular sample some peculiarity or unavoidable contamination altered the results from their common trend at the other dates of sampling.

Here again the application of 20 tons of manure depressed the nitrifying power of the soil below that shown when only 12 tons were applied.

The results also check quite satisfactorily the results of the quantitative determinations and the ammonification experiments.

As a whole the nitrification experiments bring out the same facts as were obtained by the ammonification and quantitative studies. The increases in numbers and ammonifying power were accompanied by increases in nitrifying power.

Table XIV.

The nitrification of $(NH_4)_2\ SO_4$.

(Air-dry soil.)

Plot No.		I.			II.	
	Lab. No.	Nitrate mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	Nitrate mgs. N.	Average mgs. N.
1004	121	8.335		621	14.689	
	122	8.679	8.507	622	14.900	14.794
1005	123	9.260		623	15.350	
	124	9.392	9.326	624	15.557	15.453
1006	125	10.000		625	17.892	
	126	10.000	10.000	626	17.528	17.710
1007	127	11.905		627	18.500	
	128	11.405	11.655	628	18.925	18.712
1008	129	10.000		629	16.667	
	130	10.128	10.064	630	16.725	16.696

Plot No.		III.			IV.	
	Lab. No.	Nitrate mgs. N.	Average mgs. N.	Lab. No.	Nitrate mgs. N.	Average mgs. N.
1004	1121	12.500		1321	9.422	
	1122	12.500	12.500	1322	9.000	9.211
1005	1123	13.800		1323	10.000	
	1124	13.586	13.693	1324	10.525	10.262
1006	1125	14.285		1325	12.500	
	1126	14.500	14.392	1326	12.687	12.593
1007	1127	16.666		1327	12.000	
	1128	16.137	16.401	1328	12.892	12.446
1008	1129	14.500		1329	10.000	
	1130	14.825	14.662	1330	10.889	10.444

Table XV.

The nitrification of $(NH_4)_2\ SO_4$.

(Air-dry soil.)

Plot No.	I. Nitrate mgs. N.	II. Nitrate mgs. N.	III. Nitrate mgs. N.	IV. Nitrate mgs. N.
1004	8.507	14.794	12.500	9.211
1005	9.326	15.453	13.693	10.262
1006	10.000	17.710	14.392	12.593
1007	11.655	18.712	16.401	12.446
1008	10.064	16.696	14.662	10.444

Depressions in numbers and ammonia production were likewise followed by decreases in nitrate production.

The amount of manure bringing about maximum bacterial development among ammonifying species also caused maximum multiplication and activity of the nitrifying species.

Previous results which showed that ammonification and nitrification proceeded parallel were confirmed by the work at hand.

The reasons for the increases and decrease in ammonifying and nitrifying power by the use of manure may be assumed to be the same as were mentioned in the discussion of the quantitative results. That is, the increases may be due to additions of ammonifying and nitrifying organisms or to the abundant bacterial food supply added encouraging those organisms already present in the soil to greater development. The decrease when too much manure was used may be due to action of the organic matter in the manure on the ammonifying and nitrifying organisms or possibly to the introduction of competing organisms to such an extent that the prominent ammonifiers and the nitrifiers were hindered in their development.

Comparing the nitrifying power of the soils as shown by the use of fresh and air-dry soil, much greater differences were found between the different soils when fresh soil was used. The greater differences are apparently due to the fact that the nitrifying power of the check soil was lower when tested by the fresh soil than when air-dry soil was used. Just why this should be so is not apparent, but there can be no doubt but that the fresh soil approaches more closely the natural conditions and hence is more nearly representative of what is occurring in the field.

The crop yields.

Table XVI gives the yields of corn for 1912 from the plots used in these experiments, and upon examining the figures given we find that 8 tons of manure increased the yield from 50.50 bushels to 77.62 bushels; 12 tons increased this to 86.00 bushels and 16 tons gave a slight gain to 87.00 bushels. Twenty tons however caused a depression in yield to 81.00 bushels, which was below that from the plot receiving 12 tons.

Table XVI.
The crop yields.
(Treatments and yields per acre.)

Plot No.	Treatment	Corn (1912)
1004	Check	50.50 bu.
1005	8 T. Manure	77.62 „
1006	12 T. „	86.00 „
1007	16 T. „	87.00 „
1008	20 T. „	81.00 „

Comparing these results with the bacteriological data we find almost absolute agreement. Eight tons of manure increased the number of organisms, the ammonifying and nitrifying power of the soils over the check soil and likewise increased the crop yield. Twelve tons gave a further increase in crop corresponding to an increase in numbers, ammonifying and nitrifying powers. Sixteen tons showed a very slight gain in crop, and with a few exceptions where the differences were very small a slight gain in numbers, ammonifying and nitrifying power occurred. Finally 20 tons of manure per acre depressed the crop yield below that produced with 12 tons and the numbers of bacteria, ammonifying and nitrifying powers of the soil were depressed to just that extent.

These results therefore give additional confirmation to the conclusion drawn in previous study of field soils that bacterial activities and crop production were very closely related. Furthermore, the suggestion that the determination of bacterial activities may be a means of determining the fertility or crop-producing power of a soil or at least the relative fertility of several soils is worthy of consideration in the light of the present results.

It may be suggested that the depression in crop yields by the application of 20 tons of manure per acre is due to denitrification and the decrease in numbers etc., is due to the introduction of denitrifying bacteria. This theory however, will not account for the results secured as tests of the denitrifying power of the soils were carried out both by the use of the Giltay solution and by the use of soil cultures, and in no case was any denitrification observed. The nitrates used in the media very rapidly disappeared but upon analysis the entire amount has been found to have been changed into protein, and no loss whatever occurred.

It may be stated here that it is probably the case that many instances of reported denitrification have been made on the basis of the disappearance of nitrates, and if chemical analyses had been made no losses of nitrogen would have been found.

At any rate the depression in crop yield which followed application of a large amount of manure cannot be attributed to denitrification in this case but to some other influence, possibly as has been suggested, physiological, and the danger of denitrification in field soils which has been emphasized in some quarters may be regarded as open to question.

Conclusions.

The conclusions which may be drawn from these experiments are as follows:

1. Applications of manure up to 16 tons per acre increased the numbers of organisms in the soil as shown by the growth on modified synthetic and albumen agar. The ammonifying power of the soil as shown by tests with the casein-fresh soil, albumen-fresh soil, dried blood-fresh soil, and dried blood-air-dried soil methods, and the nitrifying power tested by the ammonium sulfate-fresh soil, and the ammonium sulfate-air-dried soil methods were likewise increased.

2. The greatest increases occurred between the check soil and that receiving 8 tons per acre and between the soil receiving the 8 tons and that to which 12 tons per acre were applied. In most cases only a very slight increase occurred in the soil on which 16 tons were used over that where 12 tons were added.

3. Twenty tons of manure per acre caused a depression in numbers of bacteria, in ammonifying power, and in nitrifying power according to all the methods employed, the results being lower than those secured when 12 tons per acre were added.

4. Albumen agar permitted of the development of larger numbers of soil organisms than the modified synthetic agar and also permitted of a greater differentiation between the soils of the various plots.

5. There was a close relationship between the ammonifying power of the soils and the numbers of organisms in them according to the methods used in this work.

6. The casein-fresh soil method of testing the ammonifying power of the soil was the simplest, permitted of the greatest

differentiation between different soils, and in general was the most satisfactory.

7. The ammonium sulfate-fresh soil method for testing the nitrifying power of the soil showed the greatest differences between the various soils and is recommended as the more rational method.

8. The nitrifying power and the ammonifying power of the soil according to the methods used proceeded in the same direction.

9. Applications of manure up to 16 tons per acre increased the yield of corn from the plots in this series, the greatest increases occurring between the check plot and that receiving 8 tons per acre and between the latter and the plot to which 12 tons per acre were added.

A very slight further increase occurred when 16 tons per acre were applied.

10. Twenty tons of manure per acre depressed the crop yield below that obtained when 12 tons per acre were added.

11. The results of the bacteriological tests and the crop yields coincide almost exactly. Further evidence is thus supplied that there is a close relationship between bacterial activities and the fertility or crop-producing power of soils.

12. The depression in crop yields and bacterial activities caused by 20 tons of manure per acre cannot be attributed to denitrification as tests by the Giltay solution method and the soil method give no evidence of losses of nitrogen. The depression must therefore be due to physiological or other causes.

Nachdruck verboten.

Some Factors influencing Ammonication and Nitrification in Soils.

I. Influence of Arsenic.

By **J. E. Greaves,**
Utah Experiment Station, Logan, Utah, U. S. A.

Arsenic has been found to occur in many virgin soils and it is being added continuously to others as an insecticide, with commercial fertilizers, or with the flue dust from various smelters, and it is held by some investigators that it may accumulate in the soil in quantities sufficient to become injurious to vegetation grown upon such soil, and that the plants may in turn injure animals which feed upon them. This experiment was therefore undertaken to see if the lower plants, the ammonifiers and nitrifiers, of the soil are injured by arsenic, for they are readily experimented with and they yield results in much shorter time than can be obtained with higher plants. Such a study may indicate the way in which a study of the higher plants should be attacked, for it is probable that substances which influence these soil organisms may also influence higher plants, differing only in degree. These results must, however, be accepted only as indicative and not as absolute proof of what may occur with higher plants, for as pointed out by Guthrie and Helms[20]) all plants are not equally sensative to poisons. On the other hand it will give definite information on the toxicity of arsenic upon these soil organisms.

A careful review of the literature has been made, noting the effect of arsenic upon both the higher and lower plants, so that the results obtained in this study may be correlated with those which have been obtained elsewhere.

Historical resume.

Some early investigators[1]) claimed that plants did not absorb arsenic but Davy[2]) found arsenic to be present in peas, cabbage and swedish turnips, grown in soil containing it.

Phillips[3]) found that Coleus planted in soil containing 0.5 per cent of calcium arsenate languished and died in two weeks. Other series planted in soil containing 0.25 per cent of calcium arsenate never matured, the effect seeming to be upon the root of the plant. There were but traces of arsenic found in the ashes of the plant. From this work he draws the conclusion that plants may absorb small quantities of lead, copper, zinc and arsenic. Zinc and lead may enter into the tissues of the plant without causing any disturbance in the formation of the plant but compounds of copper and arsenic exert a distinctly poisonous effect.

Nobbe[4]) studied the effect of arsenic on plants by means of the water culture method on peas, oats, maize, and buck-wheat. He used potassium arsenate of four different strengths, viz. 3, 33, 333, and 1000 mg. of arsenic per liter. In each case the arsenic proved fatal but the time in which it killed varied. The plants receiving the smallest amount recovered for a short time but eventually died. The upper leaves of the plant were affected first, after which the stems, and finally the roots. The growth of the roots became affected on the addition of the poison and became tinged with a yellow shade. The maize was tested for arsenic with the results that the one receiving 3 mgs. showed no arsenic, the one receiving 333 mgs. yielded 0,1 mg. and the one receiving 1000 mgs., 0.5 mg. As_2O_3. The largest amount of the arsenic was found in the roots and the smallest in the leaves.

Further tests were made by the same author in which he found that the presence of one part of arsenic in one million parts of water exerted a decidely injurious influence on the normal growth of the plants.

Kellerman and Swingle[5]) treated seed wheat for twenty-four hours with a solution of arsenic but noted no deleterious effect.

Fletcher[6]) analyzed apples which had been sprayed twice during the month of June but failed to find any arsenic present.

Lyttkins[7]) found that the addition of 0.005 and 0.01 per cent of arsenious acid (as potassium salt) to garden soil in which barley was growing caused a feeble growth and a blue green color.

Stoklasa[8]) treated a number of plants thirty-five days old, with nutritive solutions containing (1) 0.019 gm arsenious acid, (2) 0.023 gm arsenious acid, and (3) 0.23 gm. of arsenic acid. In (1) there was no poisoning, in solution (2) the plants were killed in 46 to 90 hours, while in solution (3) in from 24 to 42 days.

Johnson[9]) tested the effect of arsenic on the germinating powers of seed. He found that when the arsenic comes in direct contact with the seed in only very dilute solutions the germinating powers are increased. This he explains as being due to its antiseptic properties. When moderately strong solutions were brought in direct contact with the seed a poisoning effect was observed; decreasing the germination about 15 per cent. Furthermore, he thinks the work of Nobbe[4]) to be inconclusive inasmuch as entirely different results may be obtained when the arsenic is placed in the soil instead of in water cultures.

Stoklasa[10]) tried to substitute arsenic for phosphorus in the plant organism. This he found to be impossible, but arsenic was found to induce the formation of furfurol derivatives, and consequently to increase the development of the organs of assimilation in the plant. Later he[11]) studied the influence on plants of artificial manures containing arsenic. He found that one hundred thousandth of the molecular weight of arsenious anhydride had a distinct effect on plants, while one thousandth of the molecular weight is poisonous. He further found that the toxic effect is on the activity of the chlorophyll apparatus and not so much upon the protoplasm of the plant. In applying superphosphates injury resulted only when the manure contained over 0.4 per cent of arsenic.

Bouilhac[12]) found that some algae can absorb arsenic in the form of arsenates without any apparent injury. He found that some forms were more favorably influenced by it than they were by phosphoric acid.

According to **Sorauer**[13]) less than 0.1 per cent of arsenious acid in the soil has no effect on plants.

Petermann[13]) tested barley that had been grown on soil heavily manured with superphosphates for a number of years and hence contained arsenic. He found arsenic in two of the samples but gives no statement as to the detrimental effect on the growth of the same.

Copeland and **Kahlenberg**[14]) found arsenic to be invariably poisonous to the plants tested.

Experiments carried out in England[15]) on the effect of arsenic on barley, showed that it accumulates mainly in the seed.

Collins[16]) grew both barley and tares in pots to some of which had been added arsenious and to others arsenic acid, both at the rate of eleven pounds per acre. The barley was found to contain large quantities of arsenic but no injurious effects were reported.

According to **Angell**[17]) plants of rhubarb, bean, rye, and buckwheat accumulated appreciable quantities of arsenic from soils heavily fertilized with superphosphates.

Armand and **Gutier**[18]) report having found arsenic in company with iodine in considerable amounts in the chlorophyllous algae both terrestial and marine.

Guthrie and **Helms**[19]) established the following as being the amount of arsenious acid injurious to the wheat plant: germination affected when above 0.050 per cent, germination prevented when above 0.50 per cent, growth affected when above 0.05 per cent and growth prevented when above 0.10 per cent.

Later the same authors[20]) obtained the following results for barley and rye:

	Barley per cent	Rye per cent
Germination affected (unaffected at 0.6) .		0.20
Growth affected	0.05	0.15
Growth prevented	0.10	0.30

These results show quite conclusively that some plants are more sensitive toward arsenic in the soil than are others.

The results obtained by the Royal Commission[21]) on Arsenical Poisoning are quite contrary to those obtained by other investigators. This commission conducted experiments on cereals and root crops with superphosphate containing arsenic, or to which arsenic in varying proportions was added, and concluded that the use of artificial manures was not a cause of the contamination of barley with arsenic. In no case did they find arsenic in the ripe barley grain, or in the bulbs of the roots. Very small quantities were, however, detected in the straw of the cereals and the leaves of the root crops.

Gosio[22]) grew squash under controlled conditions. At first it was watered with water and later with a solution of one part of sodium arsenate in one hundred thousand parts of water, and finally with a solution of one part of the same salt in ten thousand parts of water. He found that under these circumstances the squash accumulated arsenic until it contained as much as 0.0041 per cent of this element.

Blythe[23]) stated: "That if the root or stem of a plant is immersed in a solution of arsenious acid, the hue of the leaves soon alters in appearance, the green color becomes of a whitish or brownish hue, and the plant withers: the effect being very similar to that produced by hot water. The toxic action may be traced from below upwards, and analysis will detect minute quantities of arsenic in all portions of the plant."

He states further: "That whatever dangers the practice of steeping corn intended for seed in a solution of arsenious acid, as a preventative of smut may possess, it does not appear to influence deleterious the growth of the future plant."

Stockberger[21]) tested the ability of hops to take up arsenic as follows: He selected sixty hills of hops in a hop yard from two different plots, and, "From May 24th to August 5th, 1907, the alternate hills of one plant were watered weekly with solutions of arsenious acid and those of the other with solutions of arsenic acid. Each solution was made up in five different strengths, the arsenious acid ranging from 0.01 to

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

1 per cent and the arsenic acid from 1 to 3 per cent. Solutions of each acid were then applied to fifteen groups of two hills each in amounts so regulated as to form a gradually increasing series. In this way the total amount of arsenous acid administered to the plants of each hill ranged from one-tenth of an ounce to 24 ounces, and the arsenic acid from 2 to 20 ounces to each hill. When the hops were mature, those from each group of two hills which had received the same treatment were gathered separately, dried without sulphur, and prepared for chemical examination.

"Upon analysis, traces of arsenic, from 0.5 to 3 parts per million were found in each sample examined. While the amount of arsenic in various samples was not in direct proportion to the amount administered to the plant, the balance of evidence is in that direction." The effect of the arsenic upon the growth of the plants is not recorded.

Pfeffer[25]) states: "Arsenious acid is extremely poisonous, whereas, many both of the higher and of the lower plants can withstand large doses of arsenic acid and can accumulate large quantities of arsenic when supplied to them in this form. Gosio has observed that various fungi evolve arseneuretted hydrogen in presence of carbohydrates and arsenic compounds."

Swain and Harkins[26]) studied the vegetation of the Deer Lodge Valley near Anaconda, Montana, and found large quantities of arsenic present, the highest being 1551 parts As_2O_3 per million but the evidence obtained showed that the arsenic was deposited from the smelter smoke and was not taken up from the soil by the plant. Szameitat[27]) found in his study of arsenic that no matter how he applied the arsenic to the grape vine but little of it remained on the ripe fruit and only traces found its way into the wines.

Mestrizat[28]) found the quantity of arsenic in wines prepared from sprayed vines to be insignificant, never amounting in 10 liters of wine to as much arsenic as is found in one drop of Fowler's Solution, and he states that Dr. Ros' examined the air in close proximity to the mouth of a working man employed in spraying and found but little of the arsenic. The washing from the mouth gave the same results, while washing from the face of the individual gave 0.05 to 0.25 mg. of arsenic and from the hands 0.70 to 1.20 mg. of arsenic.

The above, however, is not in keeping with the findings of a committee[29]) from the French Academy of Medicine, for after investigating the dangers from the use of arsenical insecticides they recommended that the use of these be prohibited by law.

Headden[30]) found arsenic in virgin soil, also in the plants grown upon the soil and the meat of animals fed upon this vegetation. He found there was sufficient taken into the system from the eating of sprayed apples to give a positive arsenic test in the urine of the individual who had partaken of the fruit. And he[31]) claimed that many fruit trees were being killed outright by the Arsenic which was being used as an insecticide. This, however, was questioned by Ball[32]) who attributed much of the injury to ground water conditions. Grossenbacher[33]) claimed that arsenic played but a minor part in the killing of the trees, a fact which seems to be borne out by Headden's[34]) later work in which he finds that the trees in many of the districts were being killed by alkali. Swingle and Morris[35]) concluded that serious injury to apple trees may, under certain conditions, result from application of so called insoluble arsenical insecticides, but they thought it not improbable that the injury is due more to soluble impurities than to the slight solubility of the compounds themselves.

Tassilly and Leroide[36]) found arsenic to be present in comparatively large quantities in some sea algae, while Jadin[37]) found quantities varying from .005 mg. to .025 mg. of arsenic per 100 grams of fresh vegetables which had been grown on soil containing arsenic.

Bradley and Tartar[38]) found that alkaline waters renders lead arsenic more soluble.

Rember[39]) carried out a number of experiments in order to ascertain whether the spraying of beets roots with arsenical preparation leads to the absorption of appreciable quantities of arsenic by the beet roots. Some specimens of beets after careful washing were found to contain 0.08 mg. of As_2O_5 per kilogram, others contained less. The amount found seemed to depend upon the quantity which reached the soil during spraying. The leaves contained 0.25 mg. of As_2O_3 per kilogram.

Marks[40]) was able to render a strain of paratyphoid bacilli of the hog cholera group highly resistant to arsenic by continued growth upon culture media containing arsenic.

The Occurrance of Arsenic in Soils.

Kunkel[41]) showed arsenic to be present in many rocks and waters, while Czapek[42]) states that traces are nearly always present in soils. Herzfeld and Lange[43]) found arsenic in certain German raw sugars. This they traced to the lime stone which had been used in the manufacture of the sugar. Headden[30]) found some virgin prarie soils relatively rich in arsenic and this in keeping with my own experience. I have found arsenic to the extent of four parts per million in virgin soil and as pointed out by Headden in the cases referred to by him, it did not result from smelter fumes or any such source but was derived from the decay of the native rocks. On the other hand Headden found arsenic to occur in some cultivated orchard soils to the extent of 138 parts per million and he claims that in many places it is accumulating in sufficient quantities to become injurious to vegetation. François[44]), however, considers there to be little danger of the earth becoming unfit for vegetation from the proper use of insecticides. Hardly such an optimistic view is taken by Gruner[45]) who found arsenic to the extent of from. 0.026 per cent to 1.426 per cent present in the Reichenstein Soil. This had its origin in the gases which escaped from the primitive smelters. It appears, however, that it is not so much the total quantity of arsenic present as it is the form in which the arsenic occurs. There has been little work done on this phase of the question. I have, therefore, determined the quantity of arsenic, both total and water soluble, in many of the orchards soils of Western America. The water soluble arsenic was determined by extracting 500 grams of soil with 2000 cc. of distilled carbondioxide free water and then the arsenic determined in an aliquot part while the total arsenic was determined by extracting the soil with nitric and sulfuric acid and then determining by the Marsh[46]). The results are given in Table 1.

Table 1 giving the quantity of arsenic, parts per million occuring in average orchard soil:

Table 1.

Total arsenic	Water sol. arsenic	Soluble %	Total arsenic	Water sol. arsenic	Soluble %	Total arsenic	Water sol. arsenic	Soluble %
102	.92	.9	36	3.48	9.67	16	.72	4.50
79	6.20	7.85	33	5.16	15.63	15	1.74	11.60
64	4.1	6.41	32	3.92	12.25	13	.84	6.46
63	6.88	10.92	32	1.07	3.34	12	3.85	32.08
63	1.02	1.62	24	3.56	14.83	12	.70	5.83
62	3.38	5.45	24	1.32	6.33	11	3.40	30.91
60	1.00	1.67	20	1.08	5.04	11	1.36	12.36
55	8.87	16.13	19	6.08	30.20	10	.88	8.80
50	2.68	5.36	19	Traces		9	3.13	34.78
45	4.3	9.55	18	1.36	7.56	5	3.08	61.60
45	1.8	4.00	18	.48	2.67	5	1.08	20.80
40	5.2	13.00	17	.36	2.12	5	1.08	21.60
39	.68	1.74	16	2.50	15.60			

From the above results it may be seen that some orchards soils do contain large quantities of arsenic but there is no relationship between the total arsenic of a soil and its water soluble arsenic. So that if, as is most likey the case, the injury to plants is due to the water soluble arsenic, greater injury would result in the soil above analized which contains only five parts per million of total arsenic than in the one which contains 102 parts per million, for in the latter case there is much more in the soluble form than there is in the former. It may be seen further that one of the above soils which contains 63 parts per million of total arsenic has only 1.62 per cent of this in the soluble form while another soil having exactly the same amount of total arsenic has 10.92 per cent of it in the soluble form, nor is the arsenic of soil confined to the surface for one soil analyzed at a depth of three feet yielded 11 parts per million of total arsenic, 30.91 per cent which was soluble. So it may be safely concluded from the above that some virgin soil contains arsenic and that many orchard soils contain arsenic in large quantities but that the quantity of arsenic found in a soil is no index of the amount which is soluble in water.

Influence of arsenic upon ammonification.

Method of Experimentation.

The work was carried on with a typical bench soil, a sandy loam, fairly high in calcium and iron and supplied with an abundance of all the essential elements of plant food with the exception of nitrogen which was low, as is characteristic of the arid soils. The soil was air dried, sieved and stored in a large box so that all determinations could be made on the same soil. The determination of the ammonifying powers were made with slight modifications, by the method used by Lipman[47]). Beakers covered with Petri dish were sterilized and into these were weighed 100 gram portions of the air dried soil and one gram of dried blood. Sodium arsenate was added from a standard solution with the sterile water, while in the case of the insoluble compounds they were added to the soil in the dry form thoroughly mixed with the soil and then the water contents of the soil made up to 18 per cent with distilled sterile water. The samples were incubated at 28° C. to 30° C. for four days and the ammonia determined by transferring to Kjeldahl flasks with 250 cc. of distilled water with the addition of 2 grams of magnesium oxide and distilled into $\frac{n}{10}$ sulfuric acid. The determinations were all made in duplicates and compared with sterile blanks, so that each result reported is the average of two or more closely agreeing determinations.

The results obtained for soluble arsenic (sodium arsenate) are given in Table 2.

Table 2.

Mg. of Ammonia produced in 100 grams of soil with varying amounts of arsenic in the form of sodium arsenate.

Arsenic parts per million	Formed mg. NH_3	Arsenic parts per million	Formed mg. NH_3	Arsenic parts per million	Formed mg. NH_3
none	48.02				
1	48.24	10	45.06	55	32.12
2	52.72	15	45.06	60	32.78
3	58.12	20	36.54	65	34.82
4	53.36	25	38.90	70	34.00
5	52.68	30	38.22	75	34.40
6	51.02	35	36.00	80	32.12
7	51.66	40	32.78	85	32.68
8	46.76	45	34.80	90	33.60
9	46.76	50	32.60		

From the above results it may be seen that dilute solutions of sodium arsenate stimulates the activity of the ammonifying organisms of the soil, the greatest influence being exerted with a concentration of three parts per million and it is quite marked up to a concentration of seven parts per million. Part of this stimulating action may, however, be due to the anion and not to the cation, as Lipman in his work has noted a stimulating effect with some sodium compounds. No retarding influence is noted until the concentration of the sodium arsenate reaches twenty parts per million, after which there is a marked retarding influence on the ammonifying powers of the soil. From here the quantity of ammonia formed is about constant only a slightly greater retarding effect being noted when the concentration of the arsenic reaches ninety parts per million than when it is twenty. This is probably due to the fact that the soil is comparatively high in calcium and iron and that the sodium arsenate is changed into the difficulty soluble calcium and iron arsenates and at the soil concentration of twenty parts per million the water contents had become saturated with these difficulty soluble compounds so that even though the added quantity increases the active mass is about constant, therefore, these results cannot be taken to indicate what may happen in a soil devoid of calcium and iron in which the arsenic would remain in a soluble form. But it does show that large quantities of soluble arsenic, even up to ninety parts per million, may be added to a soil rich in calcium and iron without stopping ammonification.

The Influence of Insoluble Arsenic Compounds.

The compounds of this class tested are the ones which are being used or recommended as sprays and hence find their way into the soil in greater or less quantities. They are, lead arsenate, Paris green, zinc arsenite and arsenic trisulfide. The trisulfide is seldom used but it is of special interest in this work, inasmuch as the arsenic can be applied free from the metallic elements which accompany each of the others, and it would therefore give more nearly the influence of the arsenic than would the other compounds. In each case the quantity of the compound taken was such as to give equivalent amounts of arsenic. And the results reported are milligrams of ammonia formed per 100 grams of soil.

The results obtained are given in Table 3.

On examining the above results, we find that lead arsenate stimulates slightly at first ammonification, after which it has a retarding influence. The toxicity gradually increases as the amount of lead arsenate added to the soil increases. In no concentration tested is there any marked retarding action over the previous concentration, but a gradual decline in the ammonifying efficiency and the amount of ammonia produced is not reduced to one-half of its original power until a concentration of 760 parts of arsenic per million have been added to the soil. Even at a concentration of 1120 parts per million of arsenic, there was produced 15.20 milligrams of ammonia, or over one-third of the amount produced in the total absence of lead arsenate, showing that even this large quantity was not sufficient to kill or even to entirely stop the activity of the soil organisms. Paris green, on the other hand, acts as a strong poison to the ammonifying organisms. Before the concentration of arsenic in the soil has reached 240 parts per million, the ammonifying efficiency of the soil had been reduced one-half. Even twenty parts per million of arsenic retards very materially the ammonifying powers

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

of the soil. At the highest concentration tested (1120 parts per million) there was practically no ammonia formed.

Table 3.

Giving milligrams of ammonia formed in the presence of varying amounts of relatively insoluble arsenic compounds.

Arsenic added, parts per million	Lead arsenate mg. NH_3 formed	Paris green mg. NH_3 formed	Zinc arsenite mg. NH_3 formed	Arsenic trisulfide mg. NH_3 formed
None	40.46	39.28	34.25	39.44
20	41.82	32.64	35.02	43.46
40	38.42	28.22	33.32	46.92
80	38.41	26.52	28.22	42.16
120	35.02	26.86	24.82	42.16
160	35.36	20.74	22.44	40.80
200	35.70	21.42	21.12	39.78
240	36.72	19.72	18.02	40.13
280	33.32	19.38	17.34	41.08
320	33.66	19.38	17.34	40.44
360	28.22	15.98	17.00	40.80
400	27.28	15.30	17.80	40.46
440	27.20	13.94	17.34	40.79
480	28.80	10.20	17.00	39.78
520	25.16	10.54	17.34	40.11
560	24.34	6.12	17.68	38.77
600	24.34	4.42	18.02	40.12
640	23.46	5.10	18.02	39.77
680	22.78	4.42	17.68	39.44
720	21.76	5.10	17.85	38.41
760	20.40	4.42	17.68	38.75
800	20.00	4.42	17.51	39.10
840	20.40	4.42	17.51	38.41
880	20.40	4.42	17.68	38.72
920	20.40	4.76	17.68	38.08
960	19.04	4.42	17.34	37.74
1000	19.04	4.76	15.64	37.40
1040	18.36	3.16	15.64	36.71
1080	18.02	2.72	15.81	36.70
1120	15.20	.68	15.30	36.38

Zinc arsenite, while it has a toxic influence on the ammonifying organisms, does not bring about such a marked diminution of ammonia formed as do the other compounds. The falling of in the amount of ammonia formed is gradual and at the highest concentration (1120 parts as per million) is only slightly less than one-half of the amount produced in the total absence of arsenic, being 15.30 and 34.25 mg. of NH_3, respectively.

Arsenic trisulfide stimulates the ammonifying organisms to a greater extent than does any of the other compounds tested, and it is also less toxic. In fact the toxicity is very small throughout the concentrations tested, and it is only when the greatest concentrations are reached that the toxic influence becomes preceptible.

The amount of ammonia formed in the untreated soil or the above series shows a marked variation. This is probably due to various factors, chief amongst which was the fact that in the incubation of the set with zinc arsenite the temperature in the incubator went low during one night but the entire set of samples with zinc arsenite were treated exactly the same, so that they are directly comparable. In order to make those containing different forms of arsenic comparable with each other, i. e., the lead arsenate with the Paris green, etc., the per cent of ammonia formed in the original untreated soil has been taken as 100 per cent, and from this the per cent formed with each of the various concentrations of arsenic calculated in per cent. This gives us directly comparable results which are reported in Table 4.

Table 4.

Giving the per cent of ammonia formed in soil with varying amounts, and different forms of arsenic, considering the amount of ammonia produced in the untreated soil to be 100 in each case.

Arsenic added, parts per million	Lead arsenate % total NH_3 formed	Paris green % total NH_3 formed	Zinc arsenite % total NH_3 formed	Arsenic trisulfide, % total NH_3 formed
None	100.00	100.00	100.00	100.00
20	103.3	83.04	102.3	110.18
40	94.82	71.82	97.25	118.95
80	94.81	67.51	82.40	106.90
120	86.43	58.34	72.44	106.90
160	87.25	52.80	65.52	103.45
200	88.12	54.52	61.63	100.95
240	90.63	50.20	52.61	101.75
280	82.23	49.34	50.62	104.15
320	83.19	49.34	50.62	102.53
360	69.72	40.68	49.64	103.45
400	67.42	38.95	51.94	102.58
440	67.21	35.49	50.62	103.42
480	71.19	25.97	49.63	100.85
520	62.15	26.86	50.62	101.70
560	60.13	15.58	51.62	98.30
600	60.13	11.21	52.61	101.72
640	57.94	12.98	52.61	100.82
680	56.30	11.25	51.62	100.00
720	53.73	12.98	52.11	97.39
760	50.41	11.25	51.62	98.24
800	49.43	11.25	51.11	99.14
840	50.41	11.25	51.11	97.39
880	50.41	11.25	51.62	98.17
920	50.41	12.12	51.61	96.55
960	47.06	11.25	50.62	95.95
1000	47.06	12.12	45.67	94.82
1040	45.37	8.04	45.67	93.08
1080	44.54	6.92	46.16	93.05
1120	37.57	1.73	44.68	92.04

An examination of the results reported in the above table brings out some very interesting facts. The zinc arsenite, lead arsenate and arsenic trisulfide are very similar in their action, for they apparently stimulate the ammonifying organisms of the soil when used in small quantities and while the lead arsenate and zinc arsenite in greater concentration, exert a certain toxic influence upon the soil organisms, it increases slowly with the added salt. The power of the soil to produce ammonia when 800 parts of arsenic in the form of lead arsenate had been added was 49.43 per cent of the original soil, while with the same arsenic concentration in the form of zinc arsenite, it had been reduced to 51.11 per cent. At the highest concentration tested, 1120 parts per million, the lead arsenate had reduced the ammonifying efficiency to 37.57 per cent of its original, while the zinc arsenite had only reduced it to 44.68 per cent of its original. Furthermore, it may be seen that neither of these salts retards very materially the ammonifying powers of the soil when they be present in the quantity which analysis has shown that arsenic may occur in soils. The arsenic trisulfide stimulates more and is less toxic than either of these. The Paris green, however, retards even in the lowest concentration, very materially the ammonifying powers of the soil, and it continues to exert a toxic influence upon the ammonifiers and this increases as the Paris green added increases to such an extent that when 1120 parts of arsenic in the form of Paris green be added ammonification in the soil had practically stopped, being only 1.73 per cent of the original product.

Influence of Arsenic upon Nitrification.

Method of Experimentation.

The same soil was used in this work as was used in the ammonification tests. The method was the same as that used by Lipman[48]). Beakers covered with Petri dishes were sterilized and into these were weighed 100 gram portions of the air-dried soil and two grams of dried blood. Sodium arsenate was added from a standard solution into the sterile water and with the water to the soil, and then thoroughly stirred with a sterile spatula. The so-called insoluble arsenates were added in the form of the dry powder and then thoroughly mixed with a sterile spatula and sufficient sterile distilled water added to make the moisture content of the soil 18 per cent. These were weighed and the moisture content made up weekly to 18 per cent. They were incubated at 28° C. to 30° C. for three weeks and the nitrates determined by transferring the soil by means of 250 cc. of distilled water to a mortar containing two grams of quick lime. The soil was titurated for two minutes and then transferred to a closed bottle and allowed to stand for 12 hours, at the end of this time an aliquot portion, 25 cc., was measured into 100 cc. beakers and evaporated to dryness. The residue was treated with two cc. of phenoldisulphonic acid and equally distributed over all the residue; then allowed to stand for ten minutes. This solution was diluted with water and the excess of acid neutralized with dilute ammonia.

Table 5.

Nitric Nitrogen produced in 100 grams of soil with varying amounts of arsenic in the form of sodium arsenate.

Arsenic parts per million	mg. Nitric nitrogen formed	Arsenic parts per million	mg. Nitric nitrogen formed	Arsenic parts per million	mg. Nitric nitrogen formed
None	9.7	10	9.5	55	9.8
1	9.6	15	9.2	60	9.6
2	9.6	20	9.8	65	9.7
3	9.4	25	10.4	70	9.5
4	9.0	30	10.3	75	11.1
5	9.2	35	9.0	80	14.5
6	9.8	40	9.0	85	15.6
7	9.5	45	9.0	90	9.4
8	10.2	50	9.6	100	6.0
9	9.8				

The color produced was compared with that produced by a standard solution of potassium nitrate treated in the same manner. The determinations were all made in duplicate and compared with sterile blanks, so that each result reported is the average of two or more closely agreeing determinations.

The results obtained for soluble arsenic (sodium arsenate) are given in Table 5.

A striking general similarity is seen to exist between the results here presented and those found for the ammonification series. No toxicity is noted until 100 parts per million is reached. It is likely that the main part of the soluble arsenic applied is transformed into the comparatively insoluble iron and calcium arsenates, hence the great simularity throughout the entire series. The stimulation influence noted when the concentration is from 75 to 85 parts per million is probably partly due to the sodium ion. As Lipman[48]) has noted a marked stimulation of nitrification in soils when small quantities of either sodium sulphate or sodium chloride be applied to them.

The influence of insoluble arsenic compounds.

The same compounds were used here as were used in the ammonification series. They are lead arsenate, Paris green, zinc arsenite and arsenic trisul-

Table 6.
Nitric Nitrogen produced in 100 grams of soil to which varying amounts of the different relatively insoluble arsenic compounds have been added.

Arsenic added, parts per million	Lead arsenate mg. Nitric nitrogen formed	Paris green mg. Nitric nitrogen formed	Zinc arsenite mg. Nitric nitrogen formed	Arsenic trisulfide mg. Nitric nitrogen
None	10.5	10.4	10.2	9.5
20	17.9	10.8	10.5	10.2
40	18.7	9.4	10.8	11.3
80	14.5	9.6	10.0	13.2
120	13.5	10.0	9.8	11.3
160	13.5	9.7	10.3	11.9
200	12.5	9.9	9.3	10.2
240	11.5	10.4	10.3	10.2
280	9.5	13.4	9 .7	11.6
320	10.2	15.4	9.4	9.7
360	10.3	14.4	9.9	9.2
400	9.8	13.4	10.8	9.6
440	9.7	14.0	9.0	10.0
480	9.6	14.1	14.0	8.8
520	10.5	13.4	14.4	8.3
600	10.3	13.4	15.0	6.3
640	10.0	12.4	16.8	5.4
680	9.8	10.4	12.1	6.5
720	9.5	11.0	10.0	5.0
760	9.4	9.9	9.0	4.0
800	9.3	9.7	8.6	4.0
840	8.5	9.4	7.4	3.9
880	8.4	9.4	6.8	2.2
920	8.2	9.4	6.0	2.2
960	8.0	8.4	6.8	2.0
1000	7.9	7.4	7.0	1.0
1040	7.8	7.4	6.0	1.0
1080	7.5	5.4	5.2	1.0
1120	7.1	3.4	5.3	.8

fide. In each case the quantity of the compound taken was such as to give equivalent amounts of arsenic. The results are given in Table No. 6.

These results bring out some very interesting facts, which are of considerable theoritical and practical importance. We note a marked stimulating effect with each of the substances tested which varies greatly with the various compounds. For instance, we note a very great stimulation with lead arsenate which is greatest with the lowest concentration tested and only ceases to stimulate when 240 parts of arsenic is applied. At the lowest concentration the quantity of nitric nitrogen produced is nearly twice that produced in the untreated soil. As the concentration of the arsenic increases above 240 parts per million we find a slight falling off of the nitric nitrogen produced but a concentration of even 1120 parts of arsenic in the form of lead arsenate causes the production of nearly as much nitric nitrogen as is formed in the untreated soil. It is rather hard to decide from these results whether the stimulation noted is due to the chemical applied or whether it is due to a change in the physical condition of the soil. It is probably due to both with the chemical influence predominating.

Examining the results obtained where the Paris green was used we find a stimulating effect with the lower concentrations of arsenic which reaches its maximum when 320 parts per million of arsenic was applied. Above this it decreases and at a concentration of 760 parts per million of arsenic it commences to become toxic. This toxicity becomes greater from concentration to concentration until at the highest concentration the production of nitric nitrogen had been reduced to a point where only 3.4 milligrams of nitric nitrogen was produced. In fact, it follows in a general way the order shown with the ammonification series.

Zinc arsenite exerts no apparent influence on the formation of nitric nitrogen in the soil until the concentration reaches 480 parts per million after which a notable stimulating influence is observed. This continues until the concentration reaches 680 parts per million. Above this concentration there is a marked retarding influence upon the nitrification.

Arsenic trisulfide stimulates the formation of nitric nitrogen slightly until the concentration of the arsenic trisulfide exceeds 280 parts per million, after which there is a marked falling off in the production of nitric nitrogen and at the highest concentration tested (1120 parts per million) the production of nitric nitrogen has practically ceased.

The amount of nitric nitrogen produced in the untreated soil of the above series shows a wide variation. This is due to a variation of time, temperature and the like, which occurred with different series. Each substance was, however, with varying concentration, handled exactly the same and at the same time so the results obtained in each set are directly comparable with each other as has been done in the above discussion. But, one series is not directly comparable with another as they now stand and in order to make those containing different forms of arsenic comparable with each other, i. e., the lead arsenate with the Paris green, etc., the per cent of nitric nitrogen formed in the original untreated soil has been taken as 100 per cent, and from this the per cent formed with each of the various concentrations of arsenic calculated. The nitric nitrogen being stated as per cent of that in the untreated soil. The results thus obtained are given in Table 7.

The above results bring out clearly the difference in action between the four insoluble arsenic compounds. Lead arsenate is found to be the least toxic of the compounds tested, and its stimulating influence is the greatest. The stimulating influence is greatest with the lowest concentrations and gradually becomes less as more arsenic is applied, until at the higher concentrations it becomes toxic. At the concentration at which the greatest stimulation is exerted there is three-fourths more nitric nitrogen produced than there is in the untreated soil, while in the soil containing 1120 parts per million of arsenic in the form of lead arsenate there is 67.6 per cent as much nitric nitrogen produced as there is in the untreated soil.

Table 7.
Giving the per cent of nitric nitrogen formed in soil with varying amounts and different forms of arsenic, considering the amount of nitric nitrogen produced in the untreated soil to be 100 per cent in each case.

Arsenic added, parts per million	Lead arsenate % Nitric nitrogen formed	Paris green % Nitric nitrogen formed	Zinc arsenite % Nitric nitrogen formed	Arsenic trisulfide, % Nitric nitrogen formed
None	100	100	100	100
20	170.0	103.8	102.9	107.4
40	178.0	90.4	105.9	119.0
80	138.2	92.3	102.0	131.0
120	128.6	96.2	96.0	119.0
160	128.6	90.5	101.0	125.3
200	119.2	95.2	91.1	107.4
240	109.5	100.0	101.0	107.4
280	90.4	128.9	95.1	122.1
320	97.1	148.1	92.1	102.1
360	98.1	138.5	97.0	96.8
400	93.3	128.9	105.9	101.0
440	92.3	127.1	88.2	105.6
480	91.4	128.0	137.3	92.6
520	100.0	128.9	141.2	87.4
600	98.1	128.9	147.0	66.3
640	95.2	119.3	164.7	56.8
680	93.3	100.0	118.6	68.4
720	90.5	105.8	102.0	52.6
760	89.5	95.2	88.2	42.1
800	88.6	93.3	84.3	42.1
840	80.9	90.4	72.5	41.0
880	80.0	90.4	66.6	23.2
920	78.1	90.4	58.8	23.2
960	76.2	80.8	66.6	21.1
1000	75.2	71.2	68.6	10.5
1040	74.3	71.2	58.8	10.5
1080	74.4	51.9	50.9	10.5
1120	67.6	32.7	51.6	8.4

The Paris green, zinc arsenite and arsenic trisulfide on the other hand exert, after their first slight stimulating influence, which varies in intensity with the different compounds, a very marked toxic influence. This is greatest where the Paris green had been added and least where the zinc arsenite was added. And this fact does appear clearly established that it is not likely that quantities sufficiently large of any of the compounds lead arsenate, zinc arsenite, arsenic trisulfide, or Paris green would be added to a soil under natural systems of agriculture to very materially retard nitrification. And it appears from these results that the stimulating influence exerted may be very marked.

General Consideration.

Throughout this work there has been noted a wide difference in the quantitative action of arsenic compounds, but a striking similarity in qualitative influence.

Some compounds have been found to exert little influence on either ammonification or nitrification, as is the case with the soluble sodium arsenate. Others exert a very marked toxic influence as in the case with Paris green. All at some concentration exert either a slight or very great stimulating influence. This latter fact points definitely to the conclusion that arsenic in small quantities tends to stimulate the bacterial activity of the soil as measured by ammonification and especially by nitrification. On the other hand, the absence of any great toxic influence where the soluble arsenic was applied and the great variations in results noted with other compounds, raises the question as to whether the toxic influence is exerted by the anion or cation. In order to gain some light on this subject determinations were made of the water soluble arsenic in soil to which the various forms of arsenic were added. This was determined as follows: Quantities of lead arsenate, Paris green, zinc arsenite, and arsenic trisulfide were added to 100 gram portions of soil in quantities sufficient to give 1120 parts of arsenic per million of soil. The soil and arsenic together with two grams of dried blood were placed in sterile tumblers, the water content made up to 18 per cent and then incubated at 28° C. for three weeks. At the end of this time the soil was transferred by 1000 cc. of carbon dioxide free distilled water to large acid bottles. The mixture was left in these bottles with occasional shaking for eight days, then filtered and the arsenic determined[46]) in an aliquot part. In another set the various forms of arsenic were mixed with 100 gram portions of soil and two grams of dried blood, and the water soluble arsenic determined as above without incubation. The average of the two sets of results should give a very close approximation of the quantity of water soluble arsenic existing in the soil during the activity of the organisms.

The results are given in Table 8 as milligrams of water soluble arsenic occurring in 100 grams of the soil before and after the three weeks incubation, in which 1120 parts per million of the various forms of arsenic were added. Each is the average of two or more closely agreeing determinations.

Table 8.

Milligrams of water soluble arsenic in 100 grams of soil to which 1120 parts per million of arsenic were added.

Treatment	Lead arsenate	Paris green	Zinc arsenite	Arsenic trisulfide
Incubated three weeks. Water soluble arsenic determined	14.3	80.80	36.9	50.0
Water soluble arsenic determined direct .	20.2	82.0	31.7	5.6
Average:	17.3	81.40	34.3	27.3

These results show that there may be a great difference in the quantity of water soluble arsenic exisiting in the same soil to which various forms of arsenic have been added, and that even soil rich in iron and calcium to which arsenic has been added in large quantities may have a high water soluble arsenic content. It is much higher when the arsenic has been added in the form of Paris green than when added in the other forms. Paris green apparently becomes less soluble, while arsenic trisulfide becomes much more soluble as nitrification takes place. Now comparing these results with the nitrates and ammonia found under the several conditions, we note a general relationship between the toxicity of the substance added and the quantity of water soluble arsenic present. The greatest toxic effect is noted with the Paris green and this has the highest water soluble arsenic content. Part of this toxicity may be due to the copper ion; as, it is well known that this substance acts as a strong poison to many of the lower plants. Miss Benchley[50]) found it to be toxic also to higher plants when present only to the extent of one part per ten million of water, and while Russel[51]) states that it is not as toxic in soil as in water, he and Darkshire[52]) found it to be toxic in soils and they failed to get a stimulating influence with it. Montemartini[58]) has obtained a stimulation with copper sulphate when in dilute solutions. This, however, may have been due to the anion and not to the cation as sulphates do simulate plant growth[59]). Clark and Gage[60]), however, did find very dilute solutions of copper sulphate or colloidal copper absorbed from contact with clean metallic copper to have an invigorating influence upon bacterial activity. In order that any stimulation be noted the copper must be present in very small quantities as Jackson[61]) found that one part of copper sulphate to 50.000 parts of water killed B. coli and B. typhosus, but Kellerman and Beckwith[62]) found the common saprophytic bacteria to be more resistant to copper than is B. coli and their results show a stimulation at some concentration, so it is likely that both the copper and the arsenic assisted in the stimulation. Also with all the other compounds tested, there was either a marked or very slight stimulation. This is in keeping with the findings of other investigators, as Johnson[9]) found arsenic in dilute solutions to stimulate seeds, while Bouilhac[12]) found it to stimulate algae. The stimulation of the nitrification may be due to the arsenic either inhibiting or killing injurious species. It seems remarkable that bacteria should function in the presence of the quantity of water soluble arsenic which some of these tests have shown to be present, and one would be prone to ascribe the nitrification to something other than biological, were it not for the fact that Gosio[53]) grew moulds in organic matter containing arsenic and in fact one Penicillium brevicaule was so adapted to grow in it and evolve diethylarsine that he proposed this as a means of detecting arsenic.

The very great stimulating influence observed on the nitrification series where the zinc arsenite is used is likely due as greatly to the stimulating influence of the zinc as to that of the arsenic, as Latham[56]) found that the algae were stimulated by the presence of zinc in small quantities, and the same results have been obtained by Silberberg[57]) with higher plants. Similar results have been obtained by Ehrenberg[54]), but he found that when he sterilized the soil the zinc became toxic. This would seem to indicate that the stimulating influence which was noted was only an indirect influence and when the soil organisms were killed by heat the direct toxic influence was noted on the plant.

The lead arsenate stimulates very greatly the nitrification taking place in the soil. Part of this is due most likely to the arsenic while some is due to the lead, for Stoklasa[55]) has shown that lead when present in small quantities stimulates the growth of higher plants. And here there is the possibility that the amorphous lead arsenate improves the texture of the soil and in so doing increases the nitrification taking place in it. Little if any could be attributed to the purely catalytic influence of lead as Russel and Smith[65]) found this to be very small. Besides this there is the possibility that some of the compounds inhibit the activity of injurious species. But these, together with the question as to how great these results will vary when applied to other soils are questions which can only be answered by further work. That the results do vary with the use of different makes of lead arsenate is a fact, for one brand tested which contained a trace of nitrates stimulated the activity of the nitrifiers much greater than shown in these results, and there is the possibility in most of these compounds that part of the stimulation may be due to foreign material, but only a small fraction of the influence could be attributed to this for the arsenic trisulfide stimulated and this was the Merck pure chemical used in which impurities would be reduced to a minimum. Stoklasa ascribed the stimulating influence which he noted when arsenic and lead be applied to soil growing sugar beets, to their catalytic action on the chlorophyll apparatus of the plants, but these results would indicate it to be due to its influence on the biological transformation of the nitrogen in the soil.

Even in the case of the arsenic trisulfide it is likely that part of the influence is due to the sulfur, for Dilmon[66]) attributes much of the fertilizing action of sulfur to its action on the soil bacteria. But the arsenic plays a great part in the stimulation, otherwise there would not be such an uniformity in the stimulation with all the compounds tested. Furthermore, the arsenic trisulfide is only slightly toxic to the ammonifiers, but is extremely toxic in large concentrations to the nitrifiers. This is in keeping with the finding of the solubility of the arsenic trisulfide, it becoming more soluble as it remains in the soil. And the results which Russel and Hutchinson[64]) obtained where they used calcium sulfide are interesting in this connection. They found that after thirty days there were five times as many organisms in the soil to which calcium sulfide had been added as there were in the untreated soil, and that the ammonia and nitrates produced in this length of time was one-third greater in the treated soil than in the untreated soil. These results show considerable similarity to the ones obtained by me with the arsenic trisulfide, and it may be seen that most of these results may be interpreted better by their theory that the soil contains another group of organisms which are detrimental to bacteria than by any other. But if this theory be accepted we must still state that the soil bacteria are much more resistant to arsenic than are these other organisms and that the bacteria are able to function in the presence of large quantities of arsenic, for this is not removed as is the antiseptics used by them, for I have found as large a quantity of water soluble arsenic present at the end as at the beginning of the experiment.

Summary.

Some virgin soils contain arsenic and many cultivated soils contain it in large quantities. Some of it in the water soluble form, some in the insoluble form, but there is practically no relationship existing between the total quantity present and the amount of it in the water soluble form. It is not, however, confined to the surface foot as tests show it to be present in some cases to a depth of at least three feet.

So-called insoluble arsenical insecticides are not totally insoluble after being applied to a soil, even though the soil be high in calcium and iron. The greatest quantity is soluble where Paris green has been applied and the least where lead arsenate has been applied. Arsenic trisulfide apparently becomes more soluble on standing in soil.

One hundred parts per million of sodium arsenate may be applied to a soil rich in calcium and iron without materially decreasing the ammonifying or nitrifying powers of that soil, but smaller quantities may stimulate quite markedly this activity.

Zinc arsenite, lead arsenate and arsenic trisulfide stimulate the ammonifying activities of a soil, and their toxicity is not very marked until comparatively large quantities of arsenic are present, and the two former reduce the ammonifying and nitrifying activities only one-half when 1120 parts per million of arsenic are present. Arsenic trisulfide does not become very toxic to the ammonifying organisms even in the highest concentrations, but it nearly stops the nitrifying powers of the soil. This is likely due to the fact that it is nearly insoluble at first but becomes more soluble as bacterial action takes place.

Paris green exerts a marked toxicity on the ammonifyers, even when present in small quantities and when present in arge quantities it practically stops ammonification in soil.

All the compounds tested stimulated nitrification, being least where arsenic trisulfide was used and greatest where lead arsenate was applied.

Arsenic trisulfide and Paris green when present in large quantities nearly stopped nitrification.

Arsenic stimulated ammonification and nitrification when present in soils in small quantities, but when present in very large quantities it becomes toxic. It is not, however, even probable that lead arsenate, zinc arsenite or arsenic trisulfide will ever be applied to agricultural soil in quantities sufficient to become injurious to soil bacteria. Paris green may, but the quantity added would have to be large.

The stimulating activity of the various compounds added to the soil upon ammonifying organisms, and especially to the nitrifying organisms is partly due to the anion and partly to the cation. And much of their action may be due to their influence upon injurious species.

Water soluble arsenic may exist as such in soils to the extent of 82 parts per million without entirely stopping ammonification and nitrification and large quantities of ammonia and nitric nitrogen may be produced in a soil containing fifty parts per million of water soluble arsenic; which is a greater quantity than has been found to occur in any agricultural soil tested.

Measured in terms of their influence upon ammonification and nitrification as it takes place in the soil the toxicity of lead arsenate is least followed by zinc arsenite and arsenic trisulfide and greatest with Paris green, and from the results which have been reported in the literature on the subject this seems to be the order followed when tested out on the higher plants.

There is nothing in these results which would indicate arsenic trisulfide or zinc arsenite to be as safe an arsenical insecticide as is the lead arsenate.

1) Journ. Chem. Soc. Vol. 14. 1862. p. 209—230.
2) Jahresber. Agrik. Chem. Bd. 3. 1862. p. 83—84.
3) Journ. British Chem. Soc. Vol. 22. p. 44—231.
4) Landw. Versuchs-Stat. Bd. 30. 1883. p. 381—422.
5) Kansas Stat. Bull. Vol. 12. 1890.
6) Canad. Experim. Farm Rep. 1891. p. 190.
7) Biedermanns Centralbl. Bd. 24. 1895. p. 352.
8) Biedermanns Centralbl. Bd. 25. 1896. p. 353.
9) Exper. Stat. Record Vol. 8. p. 232—233.
10) Ann. Agron. T. 23. 1897. p. 271—477.
11) Chem. Centralbl. 1898. p. 11—43.
12) Exp. Stat. Record Vol. 11. 1900. p. 1016.
13) Journ. Brit. Chem. Soc. Vol. 82. 1902. P. II. p. 471.
14) Trans. Wisc. Acad. of Sc., Arts a. Lett. Vol. 12. 1900. p. 434—474.
15) Exper. Stat. Record Vol. 14. 1902. p. 346.
16) Journ. Soc. Chem. Ind. Vol. 21. 1902. p. 221—222; County Councils Cumberland etc. Tech. Educ. Rep. Vol. 10. 1901. pp. 1—121—125—150.
17) Chem. and Drug. Vol. 60. 1902. p. 430.
18) Compt. rend. T. 135. 1902. p. 833—838.
19) Agric. Gaz. New South Wales. 1903. p. 114—120.
20) Agric. Gaz. New South Wales. 1905. p. 853—860.
21) Annual Rep. Chem. Soc. Vol. 1. 1904. p. 221.
22) Journ. Brit. Chem. Soc. Vol. 90. 1906. P. II. p. 624.
23) Poisons, their Effect and Detection. 1906. p. 558.
24) U. S. Dept. of Agr., Bur. of Plant Ind. Bull. 121. p. 44.
25) Pfeffer, Physiology of Plants, transl. by A. J. Ewart, Sec. Ed. Vol. 1. p. 434.
26) Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 30. 1909. p. 915—928.
27) Chem. Abs. 3. 1909. p. 685.
28) Journ. Pharm. Chem. Sér. 6. T. 28. 1909. p. 293—297.
29) L'engrais. T. 24. 1909. p. 211—212.
30) Proc. Col. Sc. Soc. Vol. 9. 1910. p. 345—360.
31) Col. Exp. Stat. Bull. 131 a. 157.
32) Jl. Ec. Ento. Vol. 2. 1909. p. 143; Vol. 3. 1910. p. 187—197.
33) New York Geneva Exp. Stat. Techn. Bull. 12.
34) Colo. Expt. Stat. Bull. 155 a. 178.
35) Journ. Roy. Horticult. Soc. Vol. 37. 1911—1912. p. 236.
36) Chem. Abs. Vol. 5. 1911. p. 1292.
37) Compt. rend. T. 154. 1912. p. 893—896.
38) Journ. Indus. and Eng. Chem. Vol. 2. 1910. p. 328—329.
39) Chem. Ztschr. Bd. 35. 1911. p. 977—979.
40) Chem. Abs. 1910. p. 2678.
41) Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 44. 1905. p. 511—529.
42) Biochem. d. Pflanzen. Bd. 2. 1905. p. 862.
43) Chem. Abs. Vol. 5. 1911. p. 2342.
44) Rev. Chem. Ind. Vol. 23. p. 124—131.
45) Landw. Jahrb. Bd. 40. p. 517—557.

[46] Proc. Eight Intern. Congr. of Appl. Chem. Vol. 15. p. 121.
[47] Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 8.
[48] Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 33. p. 305.
[49] University of Calif. Publ. in Agricult. Sc. Vol. 1. p. 21.
[50] Ann. of Bot. Vol. 24. 1910. p. 571—583.
[51] Russel, Soil Conditions and Plant Growth. New York and London 1912. p. 47.
[52] Journ. Agr. Sc. Vol. 1. 1905. p. 261—279.
[53] Poisons, Their Effects and Detection. 4. Ed. p. 564.
[54] Landw. Vers. Stat.-Bd. 72. 1910. p. 15—142.
[55] Compt. rend. T. 156. 1913. p. 153—155.
[56] Bull. Torrey Bot. Club. Vol. 36. 1909. p. 285—244.
[57] Ibid. Vol. 36. 1909. p. 480—500.
[58] Bull. Bur. Agr. Intel. a. Plant Dis. Vol. 2. 1911. p. 2467.
[59] Journ. Biol. Chem. Vol. 7. 1910. p. 298.
[60] Journ. Infect Dis. 1906. p. 175—204.
[61] Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 27. 1905. p. 675.
[62] U. S. Dept. Agr. Bur. Plant Ind. Bull. 100.
[63] Expt. Stat. Rec. Vol. 26. 1912. p. 225.
[64] Journ. Agr. Sc. Vol. 5. 1913. p. 173.
[65] Journ. Agr. Sc. Vol. 1. 1906. p. 444.
[66] Compt. Rend. T. 156. 1913. p. 725—728.

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Blochwitz, Adalbert, Vergleichende Physiologie der Gattung Aspergillus, p. 497.
Brown, Percy Edgar, Bacteriological Studies of Field Soils. III., p. 523.
Greaves, J. E., Some Factors influencing Ammonication and Nitrification in Soils, p. 542.
Kellerman, K. F., McBeth, I. G., Scales, F. M., and **Smith, N. R.,** Identification and Classification of Cellulose-Dissolving Bacteria, p. 502.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 25. November 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 23|25.
Ausgegeben am 6. Januar 1914.

Nachdruck verboten.

Über Stickstoffumsetzungen einiger Aktinomyceten.

II. Mitteilung.

[Aus der Agrik.-chem. Versuchsstation Halle a. S.]

Von **F. Münter.**

Mit 3 Figuren.

Im Anschluß an meine Mitteilung über Bodenaktinomyceten (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36) sollen hier einige Stickstoffumsetzungsfragen erörtert werden. Für diese Arbeiten wurden wieder dieselben Aktinomyceten benutzt, nämlich Act. odorifer, Act. chromogenes, Act. alb. I, Act. alb. II, Act. S. a, Act. S. b und Act. S. c. Die Aufgabe war, eine Klärung über die Beteiligung dieser Organismen an den Stickstoffumsetzungen im Boden zu versuchen. Es fragte sich also, in welchem Maße Ammonstickstoff aus organischer Substanz gebildet wird. Wie verläuft die Ammoniakumsetzung? Benutzen die Aktinomyceten lieber gebundenen oder wasserlöslichen Ammonstickstoff als Nahrung? Tritt eine Salpeterzersetzung, eventuell unter Entbindung von Stickstoff ein? Binden die Aktinomyceten freien Stickstoff?

1. Ammoniakbildung aus organischer Substanz.

Die Zersetzung organischer Stickstoffverbindungen vermögen wir in gewissem Maße an der Bildung von Ammoniak zu studieren. Wie in der ersten Mitteilung nachgewiesen wurde, können die Aktinomyceten Eiweißsubstanzen als gute Nährstoffquelle verwerten. Wie gestaltet sich aber die Umsetzung? Wandeln sie nur so viel organischen Stickstoff in Ammoniakverbindungen um, als sie zum Aufbau des Körpers gebrauchen oder bilden sie beträchtliche Mengen von Ammoniaksalzen?

Es wurden folgende zwei Versuche mit gleicher Nährstofflösung angesetzt: 1000 ccm Wasser, 1,5 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2$, 5 g Dextrose, 5 g Glyzerin und eine Spur Eisenchlorid. Zu je 10 ccm Substrat wurden in ein Reagensglas 0,2 g der zu untersuchenden Substanz gegeben, 5-mal im Dampftopf je 20 Minuten sterilisiert und geimpft. Zur Verwendung kamen Kasein, Pepton, Leim und Hornmehl. Der erste Versuch wurde mit Act. odorifer und Act. S. b am 8. Febr. 1912 angesetzt, der zweite am 25. März mit den übrigen Aktinomyceten, sowie zum Vergleich eine Impfnadel voll einer Aufschwemmung von Lauchstedter Erde (1 Teil Erde, 2 Teile Wasser). Da der erstere häufiger auf Ammoniak untersucht wurde, sind nur die zum zweiten Versuche passenden Zeiten in die Tabellen eingetragen. Gleichzeitig wurde der Versuch bei 2 verschiedenen Wärmegraden, in Zimmertemperatur zwischen 12—18° C schwankend, und im Thermostaten bei 30° angesetzt. Zur Untersuchung wurden die Kulturen in Jenenser Kolben übergespült und mit Magnesia usta bis zur Trockne destilliert. Wegen des Schäumens der Nährlösung müßte stets Paraffin zugegeben werden. Für die Titration kam verdünnte Natronlauge in Anwendung, welche im Durchschnitt für 1 ccm den Wert von 0,00055 g N ergab.

Die nachfolgenden Zahlen geben die gefundenen Ammoniakstickstoffmengen in g pro Gefäß an:

Tabelle 1. Kaseïn.

Wachstumszeit	9 Tage	18 Tage	25 Tage	38 Tage	49 Tage
		Gewöhnliche Temperatur			
Act. chromogenes	0,00076	0,00432	0,00442	0,00415	0,00604
„ albus I	0,00076	0,00189	0,00604	0,00690	0,00820
„ „ II	0,00049	0,00108	0,00173	0,00113	0,00432
„ „ II	—	0,00032	0,00042	—	0,00127
„ S. a	0,00102	0,00189	0,00200	0,00690	0,00647
„ S. c.	0,00022	0,00049	0,00076	0,00620	0,00647
Erde	0,00378	0,00928	0,01224	0,01473	0,00809
Act. odorifer	0,00005	0,00003	0,00065	0,00122[1]	—
„ S. b.	0,00005	0,00008	0,00011	0,00665[1]	—
		30° C			
Act. chromogenes	0,00011	0,00361	0,00485	0,00658	0,00491
„ albus I	0,00027	0,00254	0,00437	0,00485	0,00556
„ „ II	0,00022	—	0,00146	—	0,00205
„ „ II	—	0,00042	0,00053	—	0,00069
„ S. a.	0,00011	0,00405	0,00415	0,00529	0,00394
„ S. c.	0,00022	0,00076	0,00135	0,00485	0,00297
Erde	0,00216	0,01214	0,01413	0,00545	0,00410
Act. odorifer	—	0,00016	0,00307	0,00318[1]	—
„ S. b.	—	0,00003	0,00087	0,00151[1]	—

Da ein Teil der mit Act. albus II geimpften Reagensgläser durch einen kleinen Unfall zerbrochen wurde, ist der Versuch mit diesem Aktinomyceten wiederholt worden.

Die Ammoniakbildung ging im allgemeinen in der Wärme schneller vor sich, so daß der Gehalt desselben gegen Ende des Versuches bereits wieder sank. Bei niederer Temperatur schritt die Umsetzung zwar langsamer vorwärts, erreichte aber größere Ammonstickstoffmengen, nur Act. odorifer scheint bei allen Versuchen in der Wärme größere Umsetzungsfähigkeit zu besitzen. Recht träge Lebensfähigkeit entwickelten dagegen Act. albus II und S. b. Bedeutend größere Ammoniakverbindungen erzeugte die Erde, welche auch schneller als die Aktinomyceten arbeitete.

Über das Wachstum wäre zu sagen, daß Act. odorifer bei beiden Temperaturen sehr gute Vegetation mit reicher, rein weißer Sporendecke und schwachem Erdgeruch zeigte. Fäulnisartige Gerüche traten bei keinem Aktinomyceten ein, dagegen sehr stark bei Erdimpfung. Act. S. b bildete gutes Wachstum mit weißen Sporen und färbte das Nährsubstrat dunkelbraun. Während bei gewöhnlicher Temperatur starker Wacholdergeruch auftrat, war derselbe in der Wärme schwächer und von Peptongeruch begleitet. Die übrigen Aktinomyceten, Act. chromogenes, Act. albus I und II, Act. S. a und Act. S. c, zeigten bei gewöhnlicher Temperatur gutes Bodenwachstum, aber, mit Ausnahme von Act. S. a mit seiner reichen Sporendecke, nur schwache Oberflächenvegetation und Sporenbildung. In der Wärme war die Mycelbildung geringer. Nur die bei Zimmerwärme gewachsenen Kulturen zeigten Farbveränderungen der Lösungen, indem sie gelbbraun wurden, bei Act. S. c und alb. I mit einem Stich nach Rot, nur chromogena bildete schwarzbraune Färbung. Act. S. a zeigte allein noch Erdgeruch.

---

[1] Nach 33 Tagen untersucht.

Tabelle 2. Pepton.

Wachstumszeit	9 Tage	18 Tage	25 Tage	38 Tage	49 Tage
			Gewöhnliche Temperatur		
Act. chromogenes	0,00000	0,00011	0,00054	0,00145	0,00127
„ albus I	0,00000	0,00011	0,00016	0,00027	0,00032
„ „ II	0,00000	—	0,00016	—	0,00032
„ „ II	0,00000	0,00053	0,00058	—	0,00080
„ S. a.	0,00000	0,00016	0,00016	0,00011	0,00037
„ S. b.	0,00000	0,00016	0,00016	0,00022	0,00058
Erde	0,00102	0,00566	0,00761	—	0,00468
Act. odorifer	0,00000	0,00000	0,00156	0,00268[1])	—
„ S. b.	0,00000	0,00005	0,00049	—	—
			30° C		
Act. chromogenes	0,00005	0,00032	0,00027	0,00167	0,00156
„ albus I	0,00000	0,00011	0,00027	—	0,00081
„ „ II	0,00000	—	0,00032	—	0,00059
„ „ II	—	0,00069	0,00064	—	0,00048
„ S. a.	0,00000	0,00022	0,00032	0,00017	0,00032
„ S. c.	0,00000	0,00005	0,00032	0,00054	0,00054
Erde	0,00140	0,01117	0,00750	0,00329	0,00216
Act. odorifer	—	0,00016	0,00231	0,00351[1])	—
„ S. b.	—	0,00025	0,00043	0,00043[1])	—

Die Peptonkulturen vermochten nur wenig Ammoniak zu bilden, auch blieb die Temperatur ohne Einfluß, allein Act. odorifer konnte sich etwas besser entwickeln. Ganz bedeutend größere Ammoniakmengen lieferten dagegen die Erdkulturen. Dementsprechend zeigte nur Act. odorifer gutes Oberflächenwachstum mit weißer Sporendecke, während die übrigen Aktinomyceten nur schwache, schwammige Kulturen am Boden der Gefäße erzeugten. In der Wärme war die Entwicklung noch geringer. Einzig Act. S. b bildete stets dunkelbraune Lösungen, die anderen Kulturen wurden nicht verfärbt. Sämtliche Nährlösungen behielten ihren schwachen Peptongeruch, mit Ausnahme von Act. odorifer, welcher in der Kälte Erdgeruch produzierte.

Obwohl die Stickstoffumsetzung aus Leim bei einigen Aktinomyceten in der Wärme schneller vor sich ging, erreichte sie bei gewöhnlicher Temperatur doch, wenn auch langsamer, höhere Werte. So wirkte die höhere Temperatur bei Act. odorifer, Act. S. a und S. b günstig auf die Schnelligkeit der Ammonbildung. Das umgekehrte Verhältnis trat bei Act. chromogenes und Act. albus I ein. Eine kräftige Zersetzung zeigte eigentlich nur Act. S. a, ohne daß sie an die Werte der Erdkulturen heranreichen konnte. Recht schwache Fähigkeit entfalteten Act. albus II und Act. S. b.

Wie im allgemeinen höhere Ammoniakwerte gegenüber Pepton gefunden wurden, so trat auch bei ersteren bessere Vegetation ein. Gutes Oberflächenwachstum mit Sporendecke bildeten in der Wärme nur Act. odorifer, Act. S. a und S. b, bei gewöhnlicher Temperatur auch noch Act. albus I und Act. S. c. Im übrigen vermochten die Aktinomyceten nur

---

[1]) Nach 33 Tagen untersucht.

Tabelle 3. Leim.

Wachstumszeit	9 Tage	18 Tage	25 Tage	38 Tage	49 Tage
Gewöhnliche Temperatur					
Act. chromogenes	0,00000	0,00016	0,00092	0,00156	0,00196
„ albus I	0,00000	0,00016	0,00043	0,00378	0,00493
„ „ II	0,00000	—	0,00043	—	0,00037
„ „ II	0,00000	0,00037	0,00042	—	0,00048
„ S. a.	0,00000	0,00032	0,00097	0,00485	0,00743
„ S. c.	0,00000	0,00005	0,00043	0,00016	0,00303
Erde	0,00081	0,00399	0,00928	0,01133	0,00759
Act. odorifer	0,00000	0,00008	0,00000	0,00273[1]	—
„ S. b.	0,00000	0,00005	0,00000	0,00038[1]	—
30° C					
Act. chromogenes	0,00005	0,00027	0,00000	0,00108	0,00049
„ albus I	0,00000	0,00032	0,00000	0,00043	0,00038
„ „ II	0,00016	—	0,00011	—	0,00053
„ „ II	—	0,00037	0,00053	—	0,00069
„ S. a.	0,00054	0,00248	0,00463	0,00512	0,00690
„ S. c.	0,00000	0,00022	0,00000	0,00038	0,00086
Erde	0,00394	0,01030	0,01073	0,00771	0,00340
Act. odorifer	—	0,00027	0,00329	0,00453[1]	—
„ S. b.	—	0,00011	0,00151	0,00221[1]	—

schwaches Bodenwachstum hervorzurufen. Allein Act. S. b färbte seine Nährlösung braun, während bei Act. albus I in der nächsten Umgebung der Bodenkulturen in der Flüssigkeit ein roter Schein auftrat. Ein spezieller Geruch wurde nicht wahrgenommen.

Tabelle 4. Hornmehl.

Wachstumszeit	9 Tage	18 Tage	25 Tage	38 Tage	49 Tage
Gewöhnliche Temperatur					
Act. chromogenes	0,00000	0,00011	0,00027	0,00027	0,00032
„ albus I	0,00005	0,00027	0,00049	0,00016	0,00032
„ „ II	—	0,00011	0,00022	—	0,00043
„ „ II	—	0,00021	0,00042	—	0,00080
„ S. a.	0,00005	0,00022	0,00000	0,00 000	0,00090
„ S. c.	0,00000	0,00011	0,00000	—	0,00027
Erde	0,00000	0,00038	0,00216	0,00604	0,00467
Act. odorifer	0,00000	0,00011	0,00038	0,00200[1]	—
„ S. b.	0,00005	0,00025	0,00000	0,00181[1]	—
30° C					
Act. chromogenes	0,00000	0,00000	0,00000	0,00016	0,00070
„ albus I	0,00000	0,00011	0,00016	0,00011	0,00059
„ „ II	0,00000	—	0,00016	—	0,00038
„ „ II	—	0,00027	0,00056	—	0,00042
„ S. a.	0,00054	0,00027	0,00129	0,00140	0,00205
„ S. c.	0,00000	0,00000	0,00026	0,00043	0,00038
Erde	0,00027	0,00372	0,00847	0,00248	0,00556
Act. odorifer	—	0,00011	0,00027	0,00264[1]	—
„ S. b.	—	0,00032	0,00081	0,00124[1]	—

Die schwächste Ammoniakentwicklung vermochten die Hornmehlkulturen hervorzurufen, da eigentlich nur Act. odorifer und Act. S. a in der Wärme am Schluß des Versuches etwas Ammoniakbildung zeigten.

---

[1] Nach 33 Tagen untersucht.

Auch die mit Erde geimpften Lösungen blieben gegenüber den anderen organischen Substanzen zurück. Dementsprechend war auch die Entwicklung der Aktinomyceten im allgemeinen äußerst gering. Während bei 30° C nur Act. odorifer, bei gewöhnlicher Temperatur dieser und Act. S. a Wachstum mit Sporen hervorbrachten, vegetierten die übrigen Organismen nur sehr schwach am Boden der Gläser, mit Ausnahme von Act. albus I, welcher einige große, schwammige Kolonien erzeugte. Geruchsentwicklung sowie Färbung traten nicht ein.

Am günstigsten stellt sich also die Ammoniakbildung aus Kaseïn, woran sämtliche Aktinomyceten beteiligt sind, bedeutend schwächer aus Leim, schwach aus Pepton und gering aus Hornmehl. Höhere Temperatur beschleunigt die Zersetzung zwar, sie erreicht jedoch bei gewöhnlicher Temperatur, geht sie auch langsamer vor sich, dafür höhere Werte. Act. S. a beginnt etwas leichter zu wachsen, verhält sich aber sonst ähnlich wie Act. odorifer und albus I. Schlechte Zersetzung zeigen Act. albus II und S. b, bei höherer Wärme auch Act. S. c. Die Ammoniakentwicklung geht durch Erde viel schneller vor sich und erreicht bedeutend höhere Mengen als die der Aktinomyceten.

Es trat nun die Frage auf, ob Pepton wirklich eine schlechtere Nährsubstanz bildet oder ob die geringe Zersetzung desselben infolge Luftmangels eingetreten war, da die Organismen im allgemeinen nur ein schlechtes Bodenwachstum zu entwickeln vermochten. Es sollte daher ein Versuch angesetzt werden, welcher den Aktinomyceten die Möglichkeit gab, auf der Oberfläche des Substrates zu wachsen. Reagensgläser wurden mit durch Salzsäure gereinigten, mit destilliertem Wasser gewaschenen, trockenem Sande (Saalsand bis 2 mm) bis $\frac{1}{3}$ gefüllt und 3,5 ccm Nährlösung, sowie 0,15 g der zu untersuchenden Substanz zugegeben. Als Vergleichskörper diente Kaseïn. Die Nährlösung war dieselbe wie im vorhergehenden Versuche, hatte aber doppelte Konzentration. Das Pepton wurde in der Gesamtnährlösung aufgelöst, das Kaseïn trocken den einzelnen Gefäßen zugegeben. Der Sand war so vollständig durchfeuchtet und mit einer ganz schwachen Schicht Nährlösung bedeckt. Da die Reagensrohre sehr flach lagen, wurde die Oberfläche des Substrates noch vergrößert.

Die Sterilisation erfolgte zehnmal je 30 Minuten. Geimpft am 15. Mai 1912. Es wurden folgende Gramm Ammonstickstoff gefunden:

Tabelle 5. Kaseïn.

Wachstumszeit	8 Tage	16 Tage	28 Tage
Act. odorifer	0,00053	0,00277	0,00266
„ chromogenes	0,00101	0,00243	0,00244
„ albus I	0,00101	0,00310	0,00260
„ „ II	0,00032	0,00304	0,00207
„ S. a.	0,00111	0,00299	0,00272
„ S. b.	0,00021	0,00022	0,00011
„ S. c.	0,00074	0,00261	0,00281

Sofort fällt auf, daß die Ammonstickstoffbildung aus Pepton bei den Sandkulturen bedeutend bessere Resultate ergibt als in den Nährlösungen. Reichten die gefundenen Mengen auch nicht an die bei Kaseïn gebildeten heran, so waren sie doch beträchtlich höher als bei dem vorhergehenden Versuche. Die Ammoniakbildung ist also aus Pepton geringer als aus Kaseïn.

Das Verhalten des Aktinomyceten war ziemlich gleich, nur die Act. S. b-Kulturen ergaben schwächere Zersetzungskraft.

Tabelle 6. Pepton.

Wachstumszeit	8 Tage	16 Tage	28 Tage
Act. odorifer	0,00074	0,00158	0,00159
„ chromogenes	0,00064	0,00136	0,00159
„ albus I	0,00074	0,00201	0,00159
„ „ II	0,00011	0,00158	0,00159
„ S. a.	0,00085	0,00217	0,00170
„ S. b.	0,00000	0,00000	0,00133
„ S. c.	0,00000	0,00071	0,00154

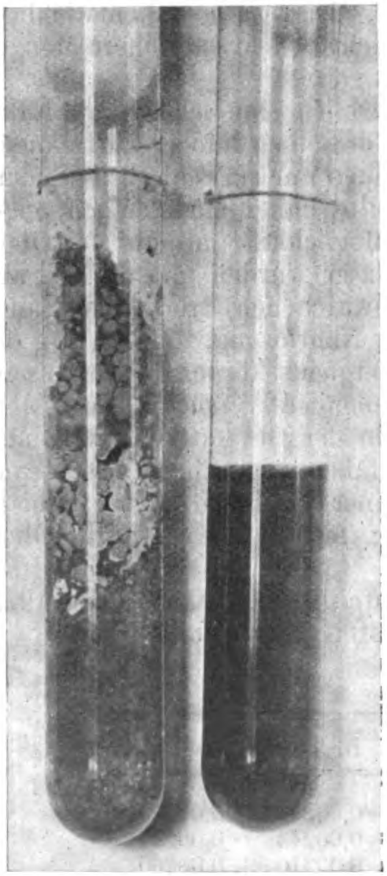


Fig. 1.

Dementsprechend zeigten auch die Peptonkulturen überall ein bedeutend freudigeres Aussehen. Act. odorifer bildete auf der Oberfläche eine dichte Decke von dicken, einzelnen Kolonien mit weißen, später (in mit Paraffin zugeschmolzenem Rohre) hellbraunen Sporen. (Die Sporen der Impfkulturen blieben weiß.) Act. albus II zeigte eine mehr zusammenhängende, dünne Decke mit weißen Sporen. Dagegen war die Oberfläche bei Act. albus II wieder mit dicken Einzelkolonien bedeckt, welche dunkelgraue Sporen trugen. Etwas schwächer war das Wachstum bei Act. S. c, mit mittelkräftigen, grausporigen Kolonien. Sehr stark trat die Vegetation von Act. S. a an der Oberfläche und im Sande auf. Die sehr dicht gewachsenen Einzelkolonien bildeten bald eine mittelstarke, einheitliche Decke mit gelblichweißen Sporen. Sämtliche Gonidien tragenden Aktinomyceten hatten ein trockenes Oberflächenaussehen. Speckglänzende Kolonien bildeten dagegen Act. chromogenes und Act. S. b. Ersterer wuchs in einer starken lederartigen, braunen Schicht, ohne Sporen zu bilden. Act. S. b brachte bräunliche, später schwarz werdende, lederartige runzliche Einzelkolonien hervor, von denen einige eine trockene, graue Sporendecke trugen. Abbildung 1 zeigt das gute Wachstum von Act. albus II auf Sand-Peptonnährboden, während in der Peptonlösung keine Vegetation zu bemerken ist.

Man kann also wohl sagen, daß sich die Aktinomyceten an der Zersetzung organischer Stickstoffsubstanzen und der Ammoniakbildung in mittelstarkem Maße beteiligen und durch Luftabschluß das Wachstum, sowie die Zersetzung der Nährstoffe verringert wird. Zur Bildung des Fäulnisgeruches tragen sie nicht bei.

2. Ammoniakzersetzung.

Bei früheren Beobachtungen stellte sich heraus, daß Ammoniaksalze als Stickstoffnahrung von den Aktinomyceten gut ausgenutzt werden konnten. In welchem Maße dies geschah, ob Unterschiede bei der Verwertung auftraten, wurde bei jenen Versuchen nicht festgestellt. Für diese Untersuchung kam nun folgende Nährlösung in Anwendung: 1000 ccm Wasser, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2$, 1,0 g K_2HPO_4, 7 g Traubenzucker, 1 g Mannit und 2 g Ammoniumsulfat. Je 50 ccm dieser Lösung wurden in Erlenmeyerkolben pipettiert und diese dreimal 20 Minuten sterilisiert. Am 22. Mai 1911 fand die Impfung der Nährlösung statt. Nach 16 resp. 60-tägiger Vegetationszeit wurden die Kulturen zur Ammoniakstickstoffbestimmung in Jenenserkolben übergespült und mit Magnesia usta bei Gegenwart von Paraffin, um starkes Schäumen zu verhindern, destilliert. Von 0,021 g Ammonstickstoff waren verloren gegangen:

Tabelle 7.

Wachstumszeit	16 Tage		60 Tage	
Zugesetzt 0,0210 g N	Zersetzter Ammonstickstoff g	Verlust % Mittel	Zersetzter Ammonstickstoff g	Verlust % Mittel
Act. odorifer	0,00184 0,00230	10,35	0,00124 0,00143	6,70
„ chromogenes	0,00230 0,00322	13,80	0,00281 0,00253	13,35
„ albus I	0,00092 0,00138	5,75	0,00281 0,00235	12,90
„ „ II	0,00115 0,00161	6,90	0,00235 0,00161	9,90
„ S. a.	0,00207 0,00138	8,65	0,00281 0,00263	13,60
„ S. b.	0,00184 0,00092	6,90	0,00216 0,00207	10,60
„ S. c.	0,00092 0,00138	5,75	0,00124 0,00124	6,20

Innerhalb der längsten Versuchszeit waren im Höchstfalle nur 13 Proz. Ammonstickstoff verschwunden. Die größte Umsetzungsintensität trat dabei in den ersten zwei Wochen auf. Ein wirklicher Unterschied zwischen den einzelnen Aktinomyceten ist nicht zu bemerken. Das geringe Umsetzungsvermögen von Act. S. c beruht weniger auf der Eigenart dieses Aktinomyceten, als auf schlechtem Wachstum bei diesem Versuche. Auch bei den übrigen Kulturen trat nur mittlere Vegetation ein.

Zur Kontrollierung wurde der Versuch im April 1912 wiederholt. Die Nährlösung blieb fast dieselbe, nur wurden statt 1 g Mannit 3 g Glyzerin verwendet. Eine zweite Versuchsreihe bei Gegenwart von $CaCO_3$ konnte nicht berücksichtigt werden, da, wie sich später herausstellte, die Stickstoffzahlen unsicher waren, denn durch die Sterilisation bei Gegenwart von kohlensaurem Kalk war etwas Ammonsalz zersetzt worden. Die gefundenen Stickstoffverluste (ohne $CaCO_3$) sind nun folgende:

Tabelle 8.

Wachstumszeit	12 Tage		20 Tage		42 Tage	
Zugesetzt 0,0184 g N	Zersetzter Ammonstickstoff g	Verlust %	Zersetzter Ammonstickstoff g	Verlust %	Zersetzter Ammonstickstoff g	Verlust %
Act. odorifer	0,00213	11,58	0,00254	13,80	0,00251	13,64
„ chromogenes . .	0,00136	7,39	0,00378	20,54	0,00251	13,64
„ albus I	0,00009	0,49	0,00317	17,23	0,00274	14,89
„ „ II	0,00285	15,49	0,00306	16,63	0,00274	14,89
„ S. a.	0,00197	10,71	0,00284	15,43	0,00251	13,64
„ S. b.	0,00009	0,49	0,00056	3,04	0,00160	8,70
„ S. c.	0,00230	12,50	0,00306	16,63	0,00274	14,89

Wieder findet sich die größte Wachstumsintensität im allgemeinen am Anfang des Versuches. Hier, in den ersten zwölf Tagen beträgt die höchste verschwundene Ammoniakmenge zwischen 15—16 Proz., also ein wenig höher als im ersten Versuche. Ein wesentlicher Unterschied im Zersetzungsvermögen ist auch wiederum nicht bemerkbar. Wenn die umgesetzte Ammoniakmenge nach 42 Tagen etwas geringer ist, so kann wohl angenommen werden, daß die Kulturen schwächer gewachsen waren. Eine Rückbildung von Ammonverbindungen ist in dieser kurzen Zeit wohl nicht anzunehmen.

Wie bereits nach diesen Zahlen zu erwarten ist, zeigte Act. S. b schwaches Wachstum, während die übrigen Organismen gute Vegetation mit Sporenbildung erzeugten. Die Kulturen der zweiten Serie, bei Gegenwart von kohlensaurem Kalk, hatten sich noch besser entwickelt. Vermutlich hat die aus Ammonsulfat gebildete freie Schwefelsäure schädlich gewirkt.

Was war nun aus dem umgesetzten Ammonstickstoff geworden? War er in organischen Verbindungen festgelegt? Hatten die Aktinomyceten Salpeter gebildet oder gar Stickstoff entbunden? Zur Klärung dieser Fragen wurde folgender Versuch angesetzt.

1000 ccm Wasser, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 2,0 g K_2HPO_4, 6 g Traubenzucker, 4 g Glyzerin und 2 g Ammonsulfat. Die Lösung wurde durch $CaCO_3$ neutralisiert, filtriert und sterilisiert. Die Impfung fand am 13. September 1912 statt.

Von dem zugesetzten Stickstoff wurden wiedergefunden, resp. waren verloren gegangen:

Tabelle 9.

Wachstumszeit	24 Tage		45 Tage	
Zugesetzter Ammonstickstoff 0,02287 g	Ammonstickstoff wiedergefunden g	Verlust %	Ammonstickstoff wiedergefunden g	Verlust %
Act. odorifer	0,01817	20,55	0,01925	15,83
„ chromogenes	0,02070	9,49	0,01902	16,83
„ albus I	0,02020	11,67	0,02038	10,89
„ „ II	0,01975	13,64	0,01925	15,83
„ S. a.	0,01840	19,54	0,01947	14,87
„ S. b.	0,02070	9,49	0,02038	10,89
„ S. c.	0,01880	17,80	0,01947	14,87

Wieder war, wie zu erwarten, die größte Umsetzungsintensität in den ersten drei Wochen eingetreten. Ebenso erreichten die Ammonverluste ungefähr denselben Höhepunkt wie bei den früheren Versuchen mit im Durchschnitt 15 Proz. Die Wachstumsunterschiede prägten sich bei der kürzeren Versuchszeit am stärksten aus. Actinomyces odorifer und Act. S. a bildeten die stärkste Vegetation mit kräftiger Sporendecke. Sie setzten auch den meisten Ammonstickstoff um mit 20,6 und 19,5 Proz. Die übrigen Organismen entwickelten sich am Gefäßboden in der Flüssigkeit zu starken schwammigen Kolonien, Act. S. b dagegen schwächer, natürlich sämtlich ohne Sporenbildung.

Wie gestaltete sich nun die Salpeterbildung?

Tabelle 10.

Wachstumszeit	24 Tage		45 Tage	
Zugegebener N 0,02287 g	Gefundener Salpeter N g	%	Gefundener Salpeter N g	%
Act. odorifer	0,00049	2,14	0,00027	1,18
„ chromogenes . . .	0,00044	1,92	0,00022	0,96
„ albus I	0,00022	0,96	0,00016	0,70
„ „ II	0,00027	1,18	0,00027	1,18
„ S. a.	0,00060	2,62	0,00033	1,44
„ S. b.	0,00027	1,18	0,00022	0,96
„ S. c.	0,00038	1,66	0,00016	0,70

Wenn auch nur eine geringe Salpeterbildung vorhanden war, trat sie doch ein. Dies ist zu beachten, denn der Stickstoff konnte nicht etwa als fest gebundener Ammonstickstoff vorhanden gewesen sein, da keine absorbierenden Substanzen vorhanden waren. Unterschiede lassen sich wenig finden. Wie Actinomyces odorifer und S. a mehr Ammonsalz zersetzten, bildeten sie auch infolge des guten Wachstums die größte Salpeterstickstoffmenge mit 2 Proz. vom zugesetzten Stickstoff.

Tabelle 11.

Wachstumszeit	12 Tage		13 Tage	
Zugesetzter Ammon-N	0,0184 g N		0,01680 g N	
	Gefundener Salpeterstickstoff g	%	Gefundener Salpeterstickstoff g	%
Act. odorifer	0,00017	0,92	0,00049	2,91
„ chromogenes . . .	0,00000	0,00	0,00006	0,36
„ albus I	0,00011	0,60	0,00071	4,23
„ „ II	0,00022	1,20	0,00071	4,23
„ S. a.	0,00022	1,20	0,00044	2,62
„ S. b.	0,00000	0,00	0,00055	3,27
„ S. c.	0,00022	1,20	0,00055	3,27

Zur Bestätigung dieser Salpeterfunde sollen hier noch die Nitratbestimmungen zweier Versuche angeführt werden. Die erste Zahlenreihe betrifft den in Tabelle 8 angegebenen Ammonumsetzungsversuch. Die zweite einen bei Gegenwart von kohlensaurem Kalk angesetzten Ammonoxydationsversuch. Wegen der unsicheren Ammoniakzahlen ist derselbe nicht veröffentlicht. Für diese Salpeterzahlen kommt es jedoch nicht in Betracht, ob die Kulturlösung 1—2 Proz. Ammonstickstoff mehr oder weniger enthielt.

Die Vegetationsverhältnisse des ersten Versuches waren, mit Ausnahme von Act. S. b, gut. Noch besser entwickelten sich die Kulturen der zweiten Serie, nur Act. chromogenes blieb etwas zurück. Wir finden auch hier wieder geringe Nitratmengen. Daß sie bei dem zweiten Versuche größer sind, wird seinen Grund in dem besseren Wachstum haben, welches durch die Gegenwart des kohlensauren Kalkes veranlaßt wurde. Wir können annehmen, daß die freie Mineralsäure in größerem Maße schädlich gewirkt hat.

Zum Hauptversuch zurückkehrend, tritt nun die Frage auf, wie der Gesamtstickstoffgehalt durch die Aktinomycetenvegetation beeinflußt worden ist.

Tabelle 12.

Wachstumszeit	24 Tage		45 Tage	
Zugesetzter N 0,002287 g	Wiedergefundener Stickstoff g	Verlust %	Wiedergefundener Stickstoff g	Verlust %
Act. odorifer	0,02253	1,49	0,02287	0,0
„ chromogenes	0,02266	0,92	0,02287	0,0
„ albus I	0,02190	4,24	0,02287	0,0
„ „ II	0,02250	1,62	0,02287	0,0
„ S. a.	0,02260	1,18	0,02287	0,0
„ S. b.	0,02276	0,48	0,02287	0,0
„ S. c.	0,02250	1,62	0,02287	0,0

Bei der ersten Reihe, nach 24 Tagen, finden sich geringe Stickstoffverluste vor, doch sind dieselben wohl mehr als Fehlerquelle der Methode zu betrachten. Die Zahlen wurden derart gewonnen, daß die in Jenenserkolben übergespülte Kulturlösung mit MgO zur Ammoniakbestimmung destilliert, darauf der Kolbeninhalt mit konzentriertem H_2SO_4 + Quecksilber aufgeschlossen und der Stickstoff bestimmt wurde. Die Summe dieser gefundenen Stickstoffmengen gab obige Resultate. Immerhin ist der verloren gegangene Stickstoff gering. Zur Bestimmung nach 45 Tagen wurde der Inhalt der Kulturgefäße nach Überspülen in Jenenserkolben bei Gegenwart von Essigsäure und Zinkteile fast bis zur Trockne eingedampft und aufgeschlossen. Nach dieser Methode waren nicht die geringsten Stickstoffverluste eingetreten.

Es ließ sich also feststellen, daß die Aktinomyceten Ammoniakstickstoff als Nährsubstanz (bis 20 Proz.) gut ausnutzen können, dabei sehr geringe Salpetermengen bilden, aber keinen Stickstoff entbinden.

Nun ist es sicher, daß der Ammoniakstickstoff den Organismen im Boden nicht immer in leicht löslicher Form zur Verfügung steht. So absorbiert der Lößlehmboden des Versuchsfeldes Lauchstedt den Ammoniakstickstoff so fest, daß von einer zugesetzten Ammonsalzmenge nach 48 Stunden 19 Proz. mit Magnesia usta nicht mehr nachzuweisen waren. Im Tonboden (z. B. Gimritz bei Halle) erhöht sich dieser Verlust auf 27 Proz.

Wie verhalten sich nun die Aktinomyceten gegenüber solchem absorbierten Ammoniakstickstoff?

Um diese Frage zu lösen, wurde zuerst künstlicher Zeolith mit Ammon-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

chlorid behandelt und so lange ausgewaschen, bis keine Chlorreaktion im Spülwasser mehr eintrat. Die Nährlösung bestand aus 1000 ccm Wasser, 1,5 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 6 g Dextrose, 4 g Glyzerin. Pro Gefäß mit 50 ccm Nährsubstrat kamen 0,0714 g Ammonsulfat oder 1,984 g feiner Zeolith (unter 0,5 mm-Sieb), 2,215 g grober Zeolith (2—0,5 mm) mit 0,015 g N. Nach fünfmaligem Sterilisieren wurden die Kolben am 10. September 1912 geimpft.

Tabelle 13.

Zugesetzter. Stickstoff 0,01500 g	Verloren gegangener Stickstoff					
	Ammonsulfat		Zeolith grob		Zeolith fein	
	g N	%	g N	%	g N	%
Act odorifer[1])	0,00194	12,93	0,00438	29,20	0,00732	48,80
„ S. a.[1])	0,00139	9,27	0,00386	25,73	0,00477	31,80
„ chromogenes[1]) .	0,00083	5,53	0,00139	9,27	0,00427	28,47
„ chromogenes[2]) .	0,00161	10,73	0,00111	7,40	0,00544	36,27
„ S. b.[1])	0,00050	3,33	0,00094	6,27	0,00228	15,20
„ S. b.[2])	0,00100	6,67	0,00066	4,40	0,00549	36,60
„ albus I[2])	0,00133	8,86	0,00250	16,67	0,00622	41,47
„ „ II[2]) . . .	0,00050	3,33	0,00361	24,07	0,00727	48,33
„ S. c.[2])	0,00072	4,80	0,00194	12,93	0,00644	42,93

Der Ammonstickstoff war nur zwischen 3 und 13 Proz. ausgenutzt worden. Bedeutend besser vermochte der Zeolithammonstickstoff verwertet zu werden. So betrug die Ausnutzung bei grobem Zeolithammoniak zwischen 4 und 29 Proz., bei feinem 15—48 Proz. Ein starker Unterschied zeigt sich also auch in der Feinheit der Substanz. Während Act. odorifer, albus I und II, S. a und S. c in allen Lösungen gut wuchsen, vermochten Act. chromogenes und S. b nur bei Gegenwart des Zeolithes in feiner Form gleiche Resultate zu erzielen. Auf grobem Zeolith wuchsen letztere mittel, bei Ammonsulfatzusatz schwach.

Warum haben die Aktinomyceten den Zeolithstickstoff so bedeutend besser verwertet? Sollte die leichtlösliche Salzform zu konzentriert gewesen sein? Dies ist wohl kaum anzunehmen. Was geschah nun mit der Schwefelsäure des Ammonsulfates? Zwar vertragen diese Organismen eine gewisse Säuremenge recht gut, aber sollte die freigewordene Mineralsäuremenge doch zu groß werden? Es galt also, dieselbe abzustumpfen. Da nun die Sterilisationen von Ammonsalzlösungen bei Gegenwart von kohlensaurem Kalk Stickstoffverluste ergeben hatten, wurde das Ammonsalzsubstrat und das Calciumkarbonat jedes für sich sterilisiert und erst danach zusammengegeben. Zur Kontrollierung der Keimfreiheit blieben die Gefäße vor Impfung noch 10 Tage stehen. Die Nährlösung setzte sich zusammen aus 1000 ccm Wasser, 1,5 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2$, 5 g Dextrose, 5 g Glyzerin und eine Spur Eisenchlorid. Auf je 50 ccm Substrat kamen 0,01322 g N als feiner Ammoniumzeolith oder 0,01268 g N des Ammonsulfat. Die Impfung erfolgte am 20. Mai 1913. Natürlich wurden bei allen Versuchen stets Analysen von ungeimpften Kulturlösungen zur Kontrolle des Stickstoffgehaltes ausgeführt.

Von dem zugesetzten Ammonstickstoff wurde wiedergefunden:

---

[1]) Nach 11 Tagen analysiert.

[2]) Nach 23 Tagen analysiert.

Tabelle 14.

Wachstumszeit:	10 Tage		20 Tage		25 Tage	
Zugesetzter Ammonstickstoff 0,1268 g	Wiedergefundener Stickstoff g	Verlust %	Wiedergefundener Stickstoff g	Verlust %	Wiedergefundener Stickstoff g	Verlust %
Act. odorifer	0,01254	1,1	0,00944	25,5	0,00979	22,8
„ chromogenes . .	0,01268	0,0	0,01075	15,2	0,01028	19,0
„ albus I	0,01249	1,5	0,00429	33,8	0,00395	68,8
„ „ II	0,01268	0,0	0,01135	10,5	0,01017	19,8
„ S. a.	0,01254	1,1	0,00853	32,7	0,00752	40,7
„ S. b.	0,01268	0,0	0,01268	0,0	0,00990	21,9
„ S. c.	0,01268	0,0	0,01162	8,4	0,01028	18,9
Zugesetzter Zeolithstickstoff 0,01322 g						
Act. odorifer	0,00983	25,6	0,00673	49,1	0,00595	55,0
„ chromogenes . .	0,01292	2,3	0,01010	23,6	0,00692	47,6
„ albus I	0,01140	13,8	0,00755	42,9	0,00541	59,1
„ „ II	0,01292	2,2	0,01015	23,2	0,01017	23,1
„ S. a.	0,00771	41,7	0,00809	38,8	0,00773	41,5
„ S. b.	0,01292	2,3	0,01292	2,3	0,01125	14,9
„ S. c.	0,01292	2,3	0,01178	10,9	0,01082	18,1

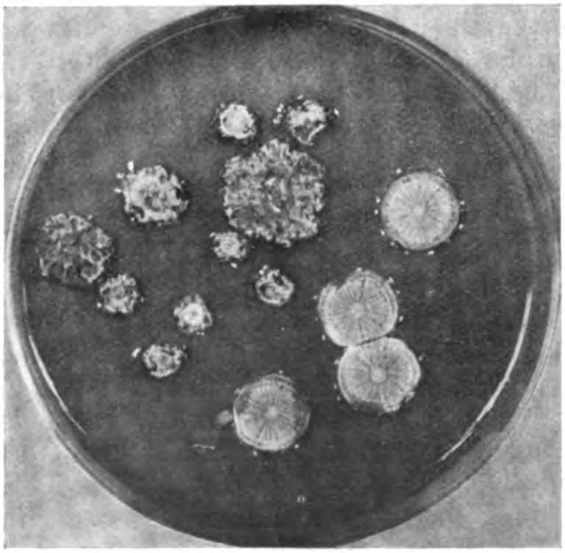


Fig. 2.

Es zeigt sich deutlich, daß die Verwertung des Ammonsulfates durch die Beigabe von Calciumkarbonat sich beträchtlich vergrößert hat. Bleibt der eine extreme Ausnahmefall von 69 Proz. durch Act. albus I unberücksichtigt, so wurden zwischen 20—40 Proz. gegen 20—60 Proz. des Zeolithstickstoffes ausgenutzt. Die Abstumpfung der Säure hatte also eine Erhöhung der Umsetzung erzielt. Dennoch scheint gebundener Ammonstickstoff nach den gefundenen Zahlen den Aktinomyceten mehr zuzusagen, obwohl die Nährlösung im Gegensatz zu den neutralen Ammonsulfatgefäßen sauer reagierte. Die, vermutlich von den Organismen selbst ausgeschiedene Säure zeigte jedenfalls keinen Nachteil auf die Vegetation. Wie sich schon aus den gefundenen Zahlen vermuten läßt, zeigten Act. odorifer, albus I und S. a ausgezeichnetes Wachstum. Doch trat insofern ein Unterschied auf, als die Zeolithkulturen bedeutend eher anwuchsen, die ganze Oberfläche der Nährlösung bedeckten, während bei den Ammonsulfatgefäßen meist nur einzelne große Kolonien entstanden. Kurz, die Zeolithkulturen zeigten allgemein ein schnelleres freudigeres Wachstum. Eine weitere Differenz machte sich noch bei sämtlichen Kulturen bemerkbar. Während die Kolonien der neutralen Ammonsulfatlösungen eine glatte Oberfläche bildeten, wuchsen die der sauer gewordenen Zeolithnährsubstrate mit stark faltiger Oberfläche. Abbildung 2 zeigt Actinomyces S. a, welcher zur Aufnahme in Agarlösung gebettet wurde. Man beachte die in neutraler Lösung sehr schön entstandene Ringbildung mit radiärer Strahlenanordnung, ähnlich einem Pflanzenstammdurchschnitt.

Bei den Versuchen mit Ammonsulfat stellte sich heraus, daß die Actinomyceten geringe Mengen Salpeter gebildet hatten und keinen Stickstoff zu entbinden vermochten. Wie stellten sich nun diese Verhältnisse bei den höheren Ammonumsetzungen des Zeoliths dar?

Für diesen Versuch kam folgende Nährlosung zur Verwendung: 1000 ccm Wasser, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl, 2,0 g K_2HPO_4, 6,0 g Traubenzucker, 4 g Glyzerin und 0,01330 g N pro Gefäß als Zeolithammoniak. Angesetzt am 26. November 1912.

Tabelle 15.

Wachstumszeit	8 Tage		13 Tage		55 Tage		64 Tage	
Zugesetzter Stickstoff 0,01330 g	Gefundener Ammonstickstoff g	Verlust %	Gefundener Ammonstickstoff g	Verlust %	Gefundener Ammonstickstoff g	Verlust %	Gefundener Ammonstickstoff g	Verlust %
Act. odorifer . . .	0,01058	18,13	0,00930	26,67	0,00808	34,80	0,00770	37,33
„ chromogenes	0,01147	12,20	0,01113	14,47	0,01083	16,47	0,00851	31,93
„ albus I . . .	0,01117	14,07	0,01136	12,93	0,00991	22,60	0,00970	24,00
„ „ II. . .	0,01175	10,33	0,01134	13,07	0,00824	33,73	0,00781	36,60
„ S. a.	0,01036	19,60	0,00830	33,33	0,00684	43,07	0,00765	37,67
„ S. b.	0,01119	14,07	0,01134	13,07	0,00975	23,67	0,00905	28,33
„ S. c.	0,01257	4,86	0,00835	33,00	0,00715	40,93	0,00873	30,46

Wieder (Tab. 15) zeigt sich das allmähliche Verschwinden des Ammonstickstoffs bis zu 43 Proz. der angewandten Stickstoffmenge. Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den einzelnen Aktinomyceten ist kaum vorhanden. Wenn bei der letzten Untersuchung einige Kulturen (Act. S. a und c) eine Ammonzunahme gegen die vorhergehende Bestimmung zeigen, so liegt dies wohl mehr an schlechterem Wachstum als an Rückbildung des Salpeterstickstoffs oder einem Zerfall von organischer Substanz. Allerdings gibt die letzte Nitratbestimmung nur geringe Stickstoffmengen an. Sollte bei dieser Umsetzung nicht mehr an eine Aufnahme des gebildeten Salpeterstickstoffs zur Plasmabildung gedacht werden müssen.

Tabelle 16.

Wachstumszeit	8 Tage		13 Tage		55 Tage		64 Tage	
Zugesetzter Stickstoff 0,01330 g	Gefundener Salpeterstickstoff							
	g	%	g	%	g	%	g	%
Act. odorifer . . .	0,00022	1,65	0,00017	1,28	0,00016	1,20	0,00000	0,00
„ chromogenes	0,00006	0,45	0,00011	0,83	0,00032	2,40	0,00005	0,38
„ albus I . . .	0,00028	2,11	0,00000	0,00	0,00059	4,44	0,00000	0,00
„ „ II. . .	0,00022	1,65	0,00000	0,00	0,00022	1,65	0,00011	0,83
„ S. a.	0,00033	2,48	0,00022	1,65	0,00049	3,68	0,00000	0,00
„ S. b.	0,00000	0,0	0,00000	0,00	0,00038	2,86	0,00011	0,83
„ S. c.	0,00000	0,0	0,00022	1,65	0,00027	2,03	0,00000	0,00

Von den Kulturen zeigten nach 13 Tagen Act. odorifer, Act. S. a und c ein sehr gutes Wachstum mit reicher Sporendecke. Dies würde dem starken Stickstoffverbrauch durchaus entsprechen. Eine gute Vegetation aber mit nur schwacher Gonidienbildung entwickelten Act. albus I und Act. albus II. Ein mittleres Bodenwachstum erzeugten Act. chromogenes und Act. S. b. Es ist also wieder festzustellen, daß mit starker Sporenbildung auch ein großer Stickstoffverbrauch parallel geht.

Trotz der starken Ammonverminderung trat eine Vergrößerung des Salpeterstickstoffgehaltes nicht ein. Die höchste Nitratstickstoffmenge wurde bei der vorletzten Untersuchung mit 4,5 Proz. gefunden, worauf ein starkes Sinken eintrat. Wie bereits oben angegeben, konnte diese Verminderung durch Verwertung des angesammelten Salpeterstickstoffs erklärt werden. Aber hier, bei Gegenwart von Zeolith, können die analytisch gefundenen Nitratstickstoffmengen auch noch von fest gebundenem Ammonstickstoff herrühren. Die Salpeterbestimmung wurde derart ausgeführt, daß nach Abdestillieren des Ammoniaks von den gesamten Kulturlösungen der Rückstand zur Nitratbestimmung benutzt wurde. Nun hat sich aber herausgestellt, daß durch eine Magnesiadestillation nicht aller Ammonstickstoff gefunden wird, wohl aber durch eine Bestimmung mit Natronlauge. Es kann also unter den hier gefundenen Salpeterzahlen auch etwas fest gebundener Ammonstickstoff vorhanden sein. Ein kleines Beispiel möge dies belegen. Zu 2 g Zeolith wurden 0,06491 g N als Ammonsulfat in 50 ccm Wasser zugegeben und nach 22 Stunden destilliert. Das Resultat war folgendes:

Tabelle 17.

Destillationsart	Gefundener N g	Verlust %
Zeolith + MgO	0,00000	0,0
Zeolith + Natronlauge.	0,00000	0,0
Zeolith + $(NH_4)_2SO_4$ + MgO	0,06164	5,17
Zeolith + $(NH_4)_2SO_4$ + Natronlauge .	0,06491	0,0
$(NH_4)_2SO_4$ + MgO	0,06491	0,0
$(NH_4)_2SO_4$ + Natronlauge	0,06491	0,0

Jedenfalls zeigen die beim Aktinomycetenversuch gefundenen Nitratmengen, daß durch Zusatz von Zeolith und erhöhter Ammonumsetzung die Salpeterbildung nicht verstärkt wird.

Für die Gesamtstickstoffbestimmung wurden die Kulturen mit Essigsäure und Zinkfeile fast bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand bestimmt. Von 0,01330 g Gesamtstickstoff wurden wiedergefunden:

Tabelle 18.

Wachstumszeit	13 Tage	55 Tage	64 Tage
Act. odorifer . . .	—	0,01330	0,01330
„ chromogenes	0,01332	0,01330	0,01330
„ albus I . . .	0,01326	0,01309	0,01309
„ „ II. . .	0,01326	0,01330	0,01330
„ S. a.	0,01326	0,01330	0,01330
„ S. b.	0,01332	0,01309	0,01325
„ S. c.	0,01332	0,01330	0,01330

Die gefundenen Resultate ergeben, daß bei Berücksichtigung der Fehlerquelle noch aller Stickstoff vorhanden ist, also keiner entbunden wurde. Folglich wurde sämtlicher verschwundener Ammonstickstoff, bis auf eine minimale, entstandene Nitratmenge, von den Aktinomyceten assimiliert.

Die Wachstumsverhältnisse bei der letzten Gesamtstickstoffuntersuchung waren folgende:

Actinomyces odorifer zeigte eine sehr gute Vegetation und zwar als eine zusammenhängende, unterbrechungslose Myceldecke auf der ganzen Flüssigkeit. Die äußerst reich vorhandenen Sporen waren von gelblicher Farbe. Schon einmal erzeugten Act. odorifer-Kulturen nicht die übliche weiße, sondern bräunliche Färbung und zwar bei einem Pepton-Sand-Substrat. (Als kurze Bemerkung sei hier eingeflochten, daß eine Act. odorifera-Kultur auf Agar-Gelatine die Eigentümlichkeit herausbildete, einen ähnlichen braunen Hof um die Kolonien, wie bei Act. chromogenes entstehen zu lassen, der sich durch weiteres Überimpfen der am kräftigsten gefärbten Kolonien allmählich verstärkte, um bei weiterer Fortpflanzung wieder zu verschwinden.) Schwacher Erdgeruch.

Lauter Einzelkolonien bildete bei guter Vegetation Act. chromogenes, ohne aber einen erkennbaren Geruch zu erzeugen. Die zahlreichen Sporen waren von weißer Farbe.

Fast ebenso verhielt sich Act. albus I, mit starker Einzelkoloniebildung ohne Geruch. Die weiße Sporendecke zeigte einige schwach-graue Stellen.

Ebenfalls ausgezeichnetes Wachstum in sehr großen Einzelkolonien bildete Act. albus II. Es trat hier allein eine ausgesprochene Kraterbildung ein, wobei die Sohle der Senkung sich teils öffnete, teils geschlossen blieb. Die dicht an dichten Sporen waren von schwarzgrauer Färbung. Erdgeruch nicht vorhanden.

Tabelle 19.

Wachstumszeit	10 Tage		20 Tage	
	Gefundener Ammonstickstoff g	Verlust g N	Gefundener Ammonstickstoff g	Verlust g N
	Zugesetzter Ammonstickstoff 0,01618 g			
Act. odorifer	0,01284	0,00334	0,01068	0,00550
„ chromogenes .	0,01467	0,00151	0,01419	0,00199[1])
„ albus I	0,01527	0,00091	0,01241	0,00377[1])
„ „ II. . . .	0,01365	0,00253	0,01165	0,00453
„ S. a.	0,01295	0,00323	0,01068	0,00550
„ S. b.	0,01473	0,00145	0,01392	0,00226[1])
„ S. c.	0,01376	0,00242	0,01095	0,00523
	Zugesetzter Ammonstickstoff 0,00809 g			
Act. odorifer	0,00378	0,00431	0,00232	0,00577
„ chromogenes .	0,00744	0,00065	0,00308	0,00501
„ albus I	0,00707	0,00102	0,00308	0,00501
„ „ II. . . .	0,00502	0,00307	0,00294	0,00515
„ S. a.	0,00361	0,00448	0,00254	0,00555
„ S. b.	0,00712	0,00097	0,00475	0,00434
„ S. c.	0,00394	0,00415	0,00216	0,00583

---

[1]) Schlechtes Wachstum und Sporenbildung.

Ähnliche weißgelbe Sporen, nur eine Spur dunkler wie odorifera, brachte Act. S. a hervor. Das sehr stark gewachsene Mycel bedeckte die Oberfläche als eine geschlossene Masse. Hier war nur ein schwacher Erdgeruch vorhanden.

In wenigen großen Einzelkolonien wuchs Act. S. b. Die Sporen blieben weiß. Der charakteristische Wocholdergeruch trat äußerst intensiv auf.

Eine sehr gute Vegetation, aber in lauter kleinen einzelnen Kolonien, zeigte Act. S. c. Die reiche Sporendecke war von grauer Farbe. Bei diesem Organismus machte sich allein ein kräftiger Erdgeruch bemerkbar.

Nun müßte noch die Frage berücksichtigt werden, ob bei ungleich hoher Stickstoffgabe und gleicher Kohlenstoffmenge eine verschiedene Ausnutzung eintrat. In je 50 ccm einer der gebräuchlichen Nährlösungen kamen 0,8 resp. 1,6 g Ammoniakzeolith mit 0,00809 resp. 0,01618 g Stickstoff.

Einen Einfluß auf die Stärke der Umsetzung zeigt die Höhe der Stickstoffmenge nicht. Da die Aktinomyceten nur soviel Stickstoff zu entnehmen scheinen, als sie zum Aufbau des Körpers gebrauchen, wird so lange gleiche Ammonzersetzung vorhanden sein als gleiche Mengen Stickstoff zugegen sind. Erst wenn die geringere Menge aufgebraucht ist und Mangel eintritt, werden sich Unterschiede zeigen. Die beiden ähnlichen Aktinomyceten, chromogenes und S. b, zeigen wieder schwächere Lebenstätigkeit.

3. Salpeterzersetzung.

Es konnte in der ersten Arbeit festgestellt werden, daß die Aktinomyceten auf Salpeternährboden ebenso gut zu wachsen vermochten, wie auf Ammonsubstraten. Daher fragte es sich, ob Nitrate ähnlich den Ammonsalzen ausgenutzt werden, ob diese Organismen Salpeter zu reduzieren oder Stickstoff zu entbinden vermochten. Allerdings war letzteres unwahrscheinlich, denn sonst wäre dies wohl schon bei den Ammonsalzen eingetreten.

Als Nährlösung wurde eine etwas veränderte Giltaysche Lösung benutzt: a) 250 ccm Wasser, 3,0 g KNO_3, 2 g Dextrose, 2 g Glyzerin; b) 250 ccm H_2O, 2 g K_2HPO_4, 1 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 0,1 g $CaCl_2$, 7,5 g Natriumzitrat und eine Spur Eisenchlorid. Beide Lösungen wurden gemischt und auf 1000 ccm mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Von diesem Nährboden wurden je 50 ccm in kleinen Erlenmeyerkolben viermal im Dampftopf sterilisiert und am 9. November 1912 geimpft. Bei Abbruch des Versuches wurden die Kulturen, da die reine Nährlösung bei einer Destillation so stark schäumte, daß die Kolbenlösung trotz aller versuchten Hilfsmittel überstieg, auf 250 ccm aufgefüllt, filtriert und davon 50 ccm unter Zusatz von Paraffin destilliert.

Als erstes Resultat konnte festgestellt werden, daß nirgends Ammoniak gebildet war. Wenn einige Titrationen einen Unterschied von 0,05 ccm gegen die blinde Bestimmung zeigten, so kann ein solches Ergebnis nicht in Betracht kommen, weil es innerhalb der Fehlergrenze liegt, die bei Ammonstickstoff auf $^2/_{10} = 0{,}0001$ g N festgehalten werden muß.

Nach der Ammondestillation wurde die Nitratmenge bestimmt.

Die Salpeterumsetzungszahlen ergeben ungefähr dieselben Resultate wie die Ammonsulfatversuche. Die größte Höhe des zersetzten Salpeters wurde von Actinomyces odorifer und Act. S. a mit 30 Proz. des zugesetzten Stickstoffs erreicht. Der Verbrauch stieg im Laufe der Zeit allmählich an. Unterschiede in der Umsetzung waren wenig zu bemerken. Actinomyces S. b zeigte wieder die bekannte Lebensträgheit, ähnlich verhielt sich auch Act. albus I.

Tabelle 20.

Wachstumszeit	9 Tage		16 Tage		37 Tage		74 Tage	
Zugegebener Salpeterstickstoff 0,01945 g N	Gefundener Salpeterstickstoff g	Verlust %	Gefundener Salpeterstickstoff g	Verlust %	Gefundener Salpeterstickstoff g	Verlust %	Gefundener Salpeterstickstoff g	Verlust %
Act. odorifer . . .	0,01860	4,37	0,01750	10,03	0,01330	31,62	0,01430	26,48
„ chromogenes	0,01830	5,91	0,01830	5,91	0,01750	10,03	0,01540	20,82
„ albus I . . .	0,01830	5,91	0,01915	1,54	0,01775	8,74	0,01670	14,14
„ „ II. . .	0,01775	8,74	0,01750	10,03	0,01695	12,85	0,01510	22,37
„ S. a.	0,01830	5,91	0,01775	8,74	0,01525	21,59	0,01365	29,82
„ S. b.	0,01940	0,26	0,01940	0,26	0,01860	4,37	0,01725	11,31
„ S. c.	0,01805	7,20	0,01805	7,20	0,01720	11,57	0,01430	26,48

Die Kulturen hatten bei der Bestimmung am 22. Januar 1913, also nach 74 Tagen, folgendes Aussehen:

Actinomyces odorifer bildete eine Anzahl großer, kräftiger, stark runzlicher Einzelkolonien mit grauweißen Sporen, dazwischen ein reichliches lockeres Gewebe und rein weiße Gonidien. Ein kräftiger Erdgeruch machte sich bemerkbar.

Ebenfalls ein gutes Wachstum zeigte Act. chromogenes. Die einzelnen Kolonien besaßen innen eine sporenlose, feuchtglänzende, orangerote Innenfläche, welche außen einen trockenen, weißen Sporenrand trug. Erdgeruch vorhanden.

Ein nur gutes Bodenwachstum vermochte Act. albus I zu entwickeln, während an der Oberfläche wenige kleine Organismen mit weißen Sporen entstanden. Dementsprechend war auch die geringe Salpeterausnutzung der Kulturen. Ohne Geruch.

Eine starke Vegetation einzelner Kolonien mit kleinen Kratern und weißen sowie grauen Sporen rief Act. albus II hervor. Schwacher Erdgeruch.

Wie gewöhnlich, erzeugte Act. S. a sehr zahlreiche, große, schöne Einzelkolonien mit weißen bis gelblichweißen Sporen. Ein Geruch war nicht zu bemerken.

Obwohl Act. S. b am geringsten Salpeterstickstoff verbraucht hatte, zeigte er doch ein gutes Wachstum großer, schwammiger Gebilde in der Flüssigkeit, aber daher keine Gonidienbildung. Der charakteristische Wacholdergeruch trat äußerst stark auf.

Ein zartes, reichliches Mycelgewebe bildete Act. S. c an der Oberfläche der Nährlösung mit weißen Sporen. Erdgeruch vorhanden.

Es blieb nun die Möglichkeit, daß der verschwundene Salpeterstickstoff entweder assimiliert oder entbunden worden war. Was zeigen nun die Gesamtstickstoffzahlen? Die Nährlösung war dieselbe wie bei dem vorhergehenden Versuche, doch enthielt sie den blinden Bestimmungen zufolge etwas weniger Stickstoff. Geimpft am 16. Dezember 1912.

Zwar zeigen die Gesamtstickstoffzahlen zum Teil geringe Stickstoffverluste, doch ist wohl anzunehmen, daß dieselben durch die Bestimmungsmethode verursacht wurden, denn gerade bei entgegengesetztem Wachstum traten die höchsten Verluste mit 4,37 Proz. N ein. Act. odorifer bildete sehr gutes Oberflächenwachstum, Act. S. b nur mittlere Bodenvegetation. Man kann also nach obigen Befunden und der Länge der Zeit von 153 Tagen annehmen, daß die Aktinomyceten auch aus vorgefundenen Nitraten keinen oder nur geringen Stickstoff entbinden.

Tabelle 21.

Wachstumszeit	35 Tage		153 Tage	
Zugesetzter Stickstoff 0,01746 g	Gefundener Gesamtstickstoff g	Verlust %	Gefundener Gesamtstickstoff g	Verlust %
Act. odorifer . . .	0,01738	0,46	0,01661	4,37
„ chromogenes	0,01715	1,78	0,01754	0,00
„ albus I . . .	0,01692	3,09	0,01708	2,17
„ „ II. . .	0,01738	0,46	0,01754	0,00
„ S. a.	0,01738	0,46	0,01685	3,49
„ S. b.	0,01692	3,09	0,01661	4,37
„ S. c.	0,01738	0,46	0,01731	0,86

Actinomyces odorifer entwickelte ein sehr gutes Wachstum. Zuerst bildeten sich einzelne Kolonien, die sich allmählich zu einer dicken Decke zusammenschlossen mit weißen Sporen. Erdgeruch vorhanden.

Im Gegensatz zu dem früher gefundenen rötlichen oder orangeroten Scheine bei Salpeternahrung der Act. chromogenes - Organismen bildeten sich bei gutem Wachstum gelbliche, speckglänzende, sporenlose Kolonien. In der Flüssigkeit entstand farbloses, schwammiges Mycel. Auch hier trat Erdgeruch auf.

Act. albus I entfaltete sein gutes Hauptwachstum in der Nährlösung, weshalb an der Oberfläche nur wenig Sporen von grauer Farbe gebildet wurden.

Act. albus II wuchs in einer kompakten Oberflächenkolonie mit grauweißen Sporen.

Ein äußerst starkes Wachstum in großen Einzelkolonien zeigte Act. S. a mit rein weißer Sporendecke. Ein Geruch war nicht vorhanden.

Wie gewöhnlich, rief Act. S. b nur ein träges, mittleres Wachstum am Boden der Flüssigkeit hervor, welches aber doch von Wacholdergeruch begleitet war.

Act. S. c bildete bei sehr gutem Wachstum ein dünnes lockeres Gewebe mit weißen Sporen.

4. Stickstoffbindung.

Nun blieb noch die Frage zu lösen, ob die Aktinomyceten imstande sind, freien Stickstoff zu sammeln.

Als Nährstoffsubstrat für den ersten orientierenden Versuch kam folgende Lösung in Anwendung. 1000 ccm Wasser, 10 g Dextrose, 2 g Galaktose, 0,5 g K_2HPO_4, 0,5 g K_3PO_4, 0,5 g NaCl, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g $CaCO_3$ und eine Spur Eisenchlorid. Da die Aktinomyceten ähnlich dem stickstoffsammelnden Azotobacter Mannit gut verwerten, wurde bei dem zweiten Versuche statt der 2 g Galaktose 5 g Mannit verwandt. 50 ccm in kleinen Erlenmeyerkolben wurden nach dreimaligem Sterilisieren geimpft. Nach Abbruch der Versuche wurde an Stickstoff, abzüglich der Impfmenge, gefunden:

Tabelle 22.

Wachstumszeit: g Stickstoff gefunden	12. Juni bis 20. Juli 1912	16. August bis 30. September 1912	16. August bis 30. Oktober 1912
Act. odorifer		0,00000 0,00005	0,00000 0,00005
Act. chromogenes	0,00016	0,00000	0,00000
Act. albus I		0,00000	0,00000
Act. albus II	0,00000 0,00016		
Act. S. a.		0,00000	0,00000
Act. S. b.	0,00002 0,00000	0,00000	0,00000 0,00010
Act. S. c.	0,00000		
Act odorifera + Rhizopus nigricans		0,00000	0,00000
Act. chromogenes + Rhizopus nigricans		0,00000 0,00021	0,00005 0,00000
Act. S. a. + Rhizopus nigricans		0,00005 0,00000	0,00000
Act. odorifer + Aspergillus niger		0,00005 0,00000	0,00005 0,00000
Act. chromogenes + Aspergillus niger		0,00005 0,00000	0,00000
Act. S. a. + Aspergillus niger		0,00000	0,00000

Eine Stickstoffbindung durch die Aktinomyceten ist hier nicht festzustellen. Die geringen gefundenen Stickstoffzahlen sind wohl nur durch die Impfung oder Fehlerquelle der Analyse entstanden. Auch der kleine Kombinationsversuch mit Rhizopus und Aspergillus verlief ergebnislos.

Zu vorstehendem Versuche wurde ein neutrales Substrat benutzt. Konnte aber eine bemerkbare Stickstoffbindung nicht etwa durch schwachsaure oder alkalische Reaktion des Nährbodens bedingt sein? Für diese Untersuchung setzte sich die Nährlösung zusammen aus: 1000 ccm Wasser, 6 g Dextrose, 4 g Glyzerin, 1 g K_2HPO_4, 0,5 g K_3PO_4, 0,5 g NaCl, 0,5 g $MgSO_4$ mit $CaCO_3$ neutralisiert und filtriert. Bei einer Serie Versuchskolben wurde das Nährsubstrat (50 ccm) mit Bernsteinsäure schwach angesäuert, die zweite erhielt einen Zusatz von kohlensauren Kalk, die dritte wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht. Nach wiederholter Sterilisierung fand am 10. September 1912 die Impfung statt. Die Stickstoffbestimmung wurde am 1. November und folgenden Tagen vorgenommen.

Nach den Analysen konnte auch hier nirgends eine Stickstoffbindung festgestellt werden.

Wie hatte sich nun die Impfmasse verhalten? Waren die Sporen über-

Tabelle 23.

Reaktion der Nährlösung	Sauer g N	Neutral g N	Alkalisch g N
Actinomyces odorifer	0,00000 0,00005	0,00000	0,00016 0,00005
Actinomyces chromogenes	0,00000 0,00005	0,00000 0,00005	0,00005 0,00005
Actinomyces albus I	0,00000	0,00005 0,00005	0,00000 0,00005
Actinomyces albus II	0,00000	0,00000	0,00005 0,00011
Actinomyces S. a.	0,00011 0,00000	0,00005 0,00000	0,00005 0,00011
Actinomyces S. b.	0,00005 0,00000	0,00005 0,00000	0,00005 0,00000
Actinomyces S. c.	0,00000	0,00000	0,00000 0,00005

haupt nicht ausgekeimt oder stellte sich eine verkrüppelte Vegetation ein? Bei sämtlichen Kulturen waren die Sporen zu einem mehr oder minder großem Mycelgewebe ausgewachsen. Eine mikroskopische Untersuchung unter Färbung mit Gentianaviolett hatte folgende Befunde (starke Vergrößerung):

1. Alkalische Nährlösung. Fast nur dünnes Mycel.

Actinomyces odorifer (Abb. 1). Viele kleine lockere Kolonien am Boden und der Oberfläche der Lösung. Auch etwas weiße Sporen vorhanden. Lockeres, langverzweigtes, dünnes Gewebe ohne Sonderheiten. Keine Fragmentation oder Teilung zu bemerken.

Act. chromogenes (Abb. 2). Viele kleine, schwammige Kolonien in der Flüssigkeit mit reichverzweigtem, dünnem, lockerem Mycel, welches nach dem Färben aus lauter kleinen, runden Körnchen zusammengesetzt erschien, die sich in einer nur schwach färbbaren Hülle befanden.

Ein Auswachsen der Act. albus I-Sporen war nicht zu bemerken.

Ein langverzweigtes, dünnes, lockeres Mycel erzeugte Act. albus II (Abb. 4). Während die inneren, älteren Gewebeteile meist zerfallen waren, blieben die äußeren Enden ungeteilt. Selten traten schwach gefärbte, stark erweiterte Mycelstücke auf, welche an ihren dünneren Stellen dunkelgefärbte Körper enthielten.

Sehr lang verzweigtes, dünnes Mycel ohne innere Gliederung mit vielen kurzen Enden bildete Act. S. a (Abb. 3). Selten schwach gefärbte Involutionsformen. Die Impfsporen waren zu vielen kleinen lockeren Kolonien in der Flüssigkeit und an der Oberfläche ausgewachsen.

Eine Vegetation von Act. S. b war nicht zu bemerken.

Act. S. c (Abb. 5) vermochte sich zu einem langgestreckten, feinen Mycel zu entwickeln, dessen Enden nach Färbung ungeteilt erschienen, während das ältere Gewebe in lauter kleine runde Körper zerfallen war, welche sich auch außerhalb der Zellen befanden.

2. Neutrale Nährlösung. Mit Ausnahme von Act. S. b waren in sämtlichen Kulturen kleine schwammige Kolonien am Boden der Gefäße entstanden. Mikroskopische Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen

traten nicht auf. Das kräftige Gewebe (z. B. Act. chromogenes, Abb. 9) ließ sich meist schwer färben, zeigte im Innern Gruppen von Körpern mit verschiedener Anzahl. Aber auch übermycelstarke dunkle Gebilde traten auf. Einige kurze Abzweigungen ließen keine Hülle erkennen.

3. Saure Nährlösung. Hier erschien das Gewebe äußerst angeschwollen, mit vielen Involutionen versetzt, und war durch Gentianaviolett meist nur äußerst schwach zu färben.

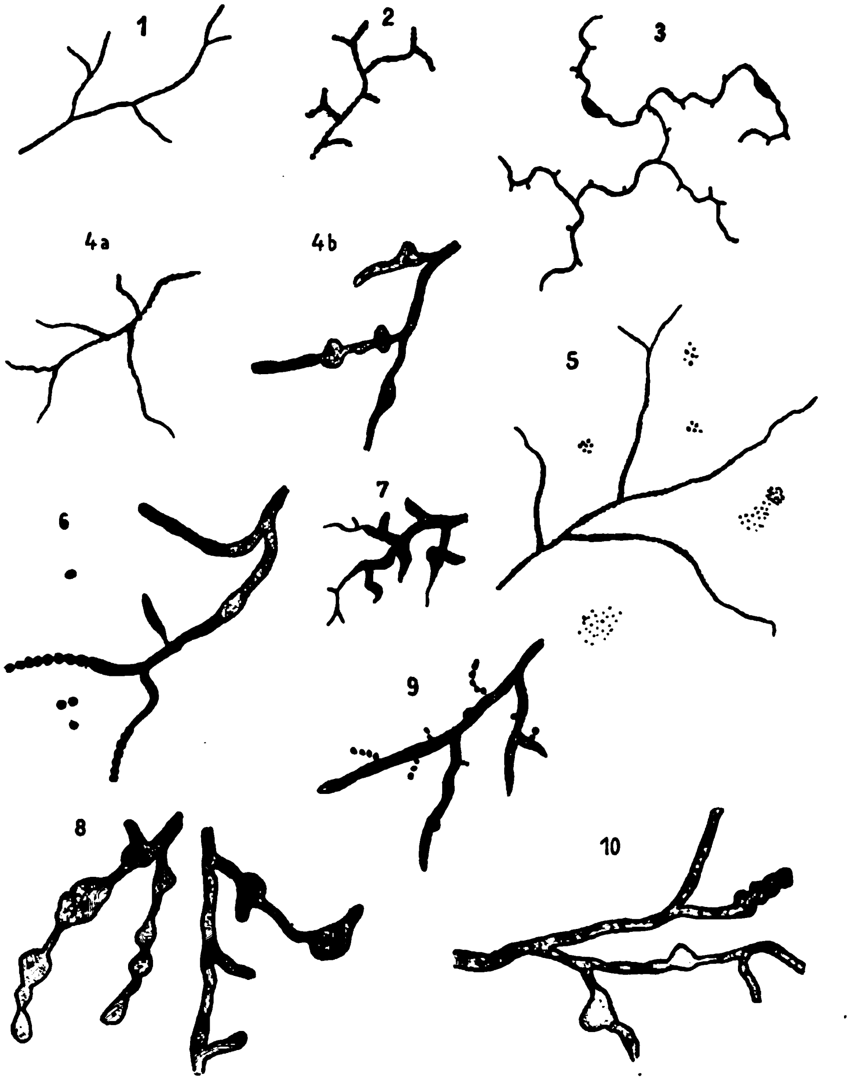


Fig. 3.

Act. odorifer wuchs in kleinen Kolonien aus der Oberfläche der Lösung unter Bildung von wenigen Sporen tragenden Enden (Abb. 6).

Viele lockere schwammige Organismen bildete Act. chromogenes (Abb. 7) in der Flüssigkeit. Das mittelstarke, kurzverzweigte Mycel war reich mit dunklen Körpern und einigen Involutionen, welche körnerfrei blieben, versetzt.

Sehr zahlreich zu kleinen lockeren Kolonien in der Flüssigkeit und an der Oberfläche war Act. S. a (Abb. 8) ausgewachsen. Sporenbildung nicht vorhanden. Das schon an und für sich aufgeweitete Gewebe zeigte sehr viel Involutionen. Im Mycel waren nie Körper anzutreffen.

Die anderen Aktinomyceten vermochten ihre Sporen nicht zum Keimen zu bringen.

Nun wäre noch die Möglichkeit gewesen, daß die Aktinomyceten in Verbindung mit anderen Bodenorganismen Stickstoff zu sammeln vermögen. Zu 50 ccm einer Nährlösung von 1000 ccm Wasser, 6 g Dextrose, 4 g Glyzerin, 1 g K_2HPO_4, 0,5 g K_3PO_4, 0,5 g NaCl, 0,5 g $MgSO_4$ und einem Tropfen Eisenchlorid wurden im Erlenmeyer 0,5 g $CaCO_3$ gegeben und das Substrat nach Sterilisation mit den in Tabelle 24 angegebenen Organismen geimpft. Zum Vergleich wurde auch Azotobacter verwendet. Nach Impfung wurden sofort einige Gefäße auf Stickstoff untersucht, um von den späteren Resultaten den in der Impfmenge vorhandenen Stickstoff abziehen zu können. Wachstumszeit 3 Monate. Die reinen Azotobacterkulturen ergaben 1,389 und 1,227 mg Stickstoff.

Tabelle 24.

Stickstoff in mg	Actinomyces odorifer	Actinomyces chromogenes	Actinomyces albus I	Actinomyces albus II	Actinomyces S. a.	Actinomyces S. b.	Actinomyces S. c.
Mucor Mucedo . . .	0,124	0,070	0,124	0,000	0,000	0,000	0,016
Penicillium glaucum	0,000	0,178	0,000	—	0,070	0,017	0,000
Penicillium candidum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Aspergillus niger . .	0,000	0,224	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Aspergillus glaucus .	0,011	0,017	—	0,064	0,071	0,017	0,000
Rosa-Hefe	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,178
Azotobacter	1,000	1,159	1,267	1,136	1,508	1,537	1,189
Mucor Mucedo Aspergillus niger Rosa-Hefe . . .	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,156	0,000
Mucor Mucedo . Aspergillus niger Rosa-Hefe . . . Azotobacter . .	0,615	0,562	0,774	0,774	0,721	1,252	0,827
Actinomyces S. b. .	0,135	0,298	0,000	0,021	0,037	—	—

Als Resultat dieses Versuches kann festgestellt werden, daß die Aktinomyceten auch in Kombination mit den hier angewandten Organismen keinen Stickstoff sammeln, sondern sogar die Tätigkeit des Azotobacters herabsetzen. Noch stärker war die Verminderung des gebundenen Stickstoffs bei Gegenwart verschiedener Organismen. In beiden letzten Fällen zeigt sich wieder deutlich die schwache Lebensentwicklung des Actinomyces S. b.

Das Impfmaterial der Aktinomyceten war meist zu einem dünnwandigen, mittelkräftigen Mycel ausgewachsen, welches oft Involutionsstellen enthielt. Sporen waren nicht vorhanden, doch eine Bildung derselben scheinbar versucht, z. B. Act. odorifer, Act. S. a, Act. alb. I (Abb. 10, dickwandiges Endstück, Act. albus I). In ziemlich regelmäßigen Entfernungen zeigten sich kleine dunkle Körper.

Ergebnisse.

1. **Die untersuchten Aktinomyceten sind sämtlich an der Ammoniakbildung aus organischer Substanz beteiligt.** Die

größten in den Nährlösungen gefundenen Ammoniakmengen, entsprechend dem besten Wachstume der Organismen, traten bei Gegenwart von Kaseïn ein. Bedeutend schwächer wurde Leim, schwach Pepton, gering Hornmehl zersetzt. Höhere Wärme beschleunigte zwar die Umsetzung meist, sie erreicht aber bei gewöhnlicher Temperatur höhere Werte. Luftabschluß behindert das Wachstum der Aktinomyceten, sowie dadurch die Zersetzung der organischen Substanz. An der Bildung von Fäulnisgerüchen sind die Aktinomyceten nicht beteiligt.

2. Ammonverbindungen bilden eine gute Nährstoffquelle. Bei der Vegetation in Ammonsulfatlösungen erzeugen die Aktinomyceten nur sehr geringe Mengen Salpeter, entbinden aber keinen Stickstoff. Der umgesetzte Ammonstickstoff wird fast sämtlich assimiliert. Durch Abstumpfung der entstehenden freien Mineralsäure wird das Wachstum bei erheblich höherer Ammonassimilation befördert. Wurde statt wasserlöslichem Stickstoff Zeolithammoniak gereicht, zeigten die Kulturen die stärkste Vegetation und die größte Ammoniakassimilation, obwohl die Kulturen sauer reagierten. In neutralen Nährlösungen ($CaCO_3$-Gegenwart) wuchsen die Aktinomyceten mit glatter Oberfläche, in organischsauren (Zeolithversuch) mit stark faltiger.

Die Größe der Stickstoffzugabe beeinflußt die Ammoniakassimilation nicht.

3. Eine Salpeterreduktion zu Ammon konnte nirgends nachgewiesen werden. Der verschwundene Salpeterstickstoff wurde fast sämtlich assimiliert, da eine sehr geringe Stickstoffentbindung nur in einzelnen Kulturen zu bemerken war.

4. Eine Stickstoffbindung fand weder in neutraler, saurer noch alkalischer Nährlösung statt. Fast sämtliche Sporenimpfungen vermochten auszukeimen. In alkalischer Lösung wurde feines, dünnes Mycel gebildet, in neutraler Nährlösung kräftiges Gewebe, bei saurer Reaktion erschien das Mycel stark angeschwollen und mit zahlreichen Involutionen versetzt.

Auch im Verein mit anderen niederen Organismen vermochten die Aktinomyceten keinen Stickstoff zu sammeln. Im Gegenteil wurde die Tätigkeit der Azotobacterkulturen durch Gegenwart der Aktinomyceten gehemmt. Noch stärker trat diese Erscheinung in Kombination mit Pilzen, Hefen und Aktinomyceten auf. Nur die Act. S. b-Kulturen vermochten das Wachstum des Azotobacters wenig zu hindern, vermutlich infolge der schwerfälligen Lebenstätigkeit dieses Aktinomyceten.

Nachdruck verboten.

Effect of CS_2 and Toluol upon Nitrification.

By **P. L. Gainey,**

Bacteriological Laboratory University of Missouri, U. S. A.

With 2 figures in the text.

The beneficial effects of the so-called process of "soil disinfection", or "partial sterilization", by means of CS_2 and other agencies upon the subsequent growth of green plants was noted as early as 1878. Since then the energy of soil chemists, physicists, and biologists alike, has been devoted to a solution of the underlying cause or causes. Many theories, backed by more or less evidence, have been advanced in explanation of the phenomenon. None, however, seem entirely satisfactory. The rather unique one of Russell and Hutchinson (11) given out in 1909 acted as a stimulus to many workers along this line, particularly the soil biologist. Since then most workers have exerted their efforts on some one or more special phases of the general problem with more or less success.

This theory of Russell and Hutchinson as well as many others, has to do primarily with the available supply of nitrogen. In fact most of the biochemical data thus far accumulated, points to the availability of nitrogen as playing a rather important role in the general question. Just how important, however, remains to be established.

A casual review of the work thus far published can leave no doubt, so far as the nitrogen question is concerned, that the first important changes produced result in a very marked increase in the liberation of combined nitrogen as ammonia. If we are to regard nitrates as the one important form of nitrogen available for use by higher plants, and this is generally accepted, then any change which this treatment may produce effecting the transformation of this additional supply of ammonia into nitrates, should be of vital importance. Regarding this point, the data thus far accumulated does not seem conclusive. The writer, believing any facts bearing directly upon the beneficial or harmful effect of such treatment upon nitrification would be of vital importance in a solution of the general problem, undertook to measure the same. The latest laboratory technique was employed and the two agencies tested — i. e., CS_2 and toluol, are the two most common substances used in experimental practice. Some rather definite and interesting results have been secured as the data to follow will show.

Historical Resume.

Since the literature bearing upon the subject is available to most interested investigators, only a very brief review of the most inportant contributions will be given.

In 1878, in his original investigations on the biological nature of nitrification, Warrington (16) noted that when air containing CS_2 was passed through soil the process was inhibited.

In November 1894 Choudon de Briailles (1) treated field plots with 40 and 100 cc. of CS_2 per sq. m. and thereafter made monthly determinations of the nitrate content. He noted that during the winter the CS_2 seemed to exert a harmful influence upon the accumulation of nitrates. However, with the first open weather in spring the reverse seemed to be true — the CS_2 caused a marked increase in nitrates over the untreated.

During this same year Perraud (9) published evidence to show that under laboratory conditions nitrification was only temporarily retarded, and that it might again become normal after a period of forty days.

Pagnoul (1895) (8) treated soil with 1.5 grams CS_2 per kg., then added a large amount of organic nitrogen in the form of blood meal. He also treated soil with 5 cc. per kg. and added nitrogen in form of "Oelkuchenmehl". In the first case nitrification was retarded fifteen or twenty days, after which it became more vigorous in treated than in nontreated soil. In the second case the retarding effect lasted for a month and vigorous activity was reached only after 44 days.

Hiltner and Störmer (1903) (4) noted a detrimental effect of CS_2 upon the accumulation of nitrates under field conditions. This, however, they regarded as beneficial in the conservation of available nitrogen, since by the time nitrates were needed nitrification had again become active.

Heinze (1906—1907) (3) publishing alone and in connection with Krüger (5), secured data which led him to believe that under field conditions, nitrification was materially decreased, or even entirely destroyed. If this treated soil, however, were brought into the laboratory and kept, very marked increases of nitrates in treated over non-treated were noted. His treatment was very strong, i. e. three treatments of 400 cc. per sq. m. The following quotation illustrates his views: „Durch diese Salpeterreaktionen wird also im besonderen auch noch direkt bestätigt, daß nicht nur die Nitrifikation im allgemeinen, sondern auch im speziellen die Nitrifikation des als N-Dünger gegebenen schwefelsauren Ammoniaks zum mindesten durch CS_2 sehr stark verzögert wird."

However, since some of his data seems rather contradictory and the larger portion of it was secured by qualo-quantitative methods, its value has been discredited by some investigators, especially Coleman.

Störmer (15) treated soil with 1.4 gr. CS_2 per kg. October 18, 1906, and then at frequent intervals determined the nitrifying efficiency by the Remy-Löhnis Method. He also made determinations of the nitrates present in the soil. His results show that up until April only 10 to 15 parts of nitrogen were nitrified when cultural solution was inoculated with 10 per cent of treated soil as compared to 100 when inoculated with untreated soil.

In the soil at the same time the relative results were 70.5 parts in treated as compared with 100 parts in non-treated. However, on July 21st, the results in cultural solution were 133.8 to 100 in favor of treated, and in soil 118.4 in treated as compared with 100 in non-treated. (Incubation 30 days at 20° C.)

Lipman (6) using the liquid culture method secured the following results two months after treating:

20 lbs. soil plus 0 13.81 mg. nitrite plus nitrate nitrogen,
20 „ „ „ 2 gr. CS_2 21.502 nitrite plus nitrate nitrogen,
20 „ „ „ 4 „ „ 28.131 „ „ „ „

In this experiment 10 per cent soil was used as inoculum and incubation 25 days at 28° C.

In 1908 Coleman (2) published perhaps the most definite laboratory data up to that date. He treated 17.5 kg. soil with 250 cc. CS_2 and found nitrification almost completely inhibited for a period of seven weeks. After this time however nitrification was much more vigorous in the treated soil than in non-treated. For example from the 5th to 7th week only 31.31 mg. nitrate nitrogen were formed per kg. treated soil, while from the 7th to 9th week 398.11 mg. were formed. At this time all added nitrogen had been nitrified and .2 per cent more $(NH_4)_2SO_4$ was added. During the following week 301.31 mg. nitrate nitrogen was formed in treated as compared with 185.68 mg. in non-treated. A duplication of this experiment, analyzed weekly, produced identical results. Colman was of the opinion that the strong addition of CS_2 was poisonous, but, like most poisons, when sufficiently diluted (as it would soon become from constant evaporation) the small amount acted as a stimulant.

His conclusion was: „Schwefelkohlenstoff wirkt anfangs stark hemmend, später aber beschleunigend auf die Nitrifikation im Boden. Es handelt sich sicherlich hier um eine Reizwirkung des Schwefelkohlenstoffs auf die nitrifizierenden Bakterien."

In 1909 Scherp (14) published a rather extensive piece of work dealing with the availability of nitrogen as effected by treating with CS_2, and among other things considerable data on nitrification. Under field conditions after treating with 500 cc. per sq. m. the following results were secured:

Treated 10/17/07	Mg. Nitrate Nitrogen per kg. dry soil	
Analyzed	Untreated	CS_2
10/17/07	1.1	2.7
10/24/07	.425	.7
11/ 6/07	.5	.85
11/28/07	.366	.45
2/25/08	.8	.6
4/23/08	1.283	3.1

Treating soil in laboratory 7 kg. soil with 120 cc. CS_2 and preventing evaporation for several days, the following results were secured:

Treated 10/10/07	Mg. Nitrate nitrogen per kg. soil	
Analyzed	Untreated	CS_2
10/10/07	4.3	2.1
10/17/07	1.6	3.2
11/24/07	3.7	—
11/18/07	5.4	3.4
2/ 4/08	23.4	10.4

Treating at rate of 5 cc. per 100 gr. soil and supplying an abundance of nitrogen in form of „Ledermehl", during courses of 35, 40, and 90 days, nitrification was twice as vigorous in check as in treated. In the presence of green manure (potato tops) treating with 2 cc. per 100 gr. soil nitrification became vigorous only after about three months. Lime seemed to have little effect in either case. In presence of rye straw nitrification was slightly better in treated (2 cc. per 100 gr. soil) after two months. In soil rich in organic matter such as compost soil, nitrification was suspended in treated soil for the longest incubation period. This, however, was only two to three months. The above experiments were carried out in large pots.

Testing nitrifying efficiency in flasks in laboratory, soils that normally converted 70 to 90 per cent of added nitrogen into nitrates in three to four weeks, when treated (app. 1 cc. per 100 gr. soil) gave only very weak nitrification even after three to four months. Even the addition of vigorous nitrifying soil did not always accelerate the process. The same was true if the soil was not placed in flasks for 3—4 weeks after treating. This same inactivity was also observed in ammonia formation. Using as an inoculum in cultural solution 4 gr. of soil from flasks in which the ratio of nitrification, after 85 days, was 19 to 7 in favor of untreated, it was found that in 3 weeks the ratio was only 4 to 3 in favor of untreated. (Treatment app. 2 cc. per 100 gr. soil). From this the writer concludes: „Aus diesem Impfversuch dürfte hervorgehen, daß die Nitrifikationsenergie des im Kolben lagernden, mit Schwefelkohlenstoff behandelten Bodens bei weitem nicht so geschwächt ist, als es nach der Nitratproduktion dieses Bodens den Anschein hat, und daß somit Ursachen anderer Art die Tätigkeit der Nitrifikationsbakterien herabgesetzt haben müssen."

In the first published results from Rothamstead Station by Russell and Hutchinson (1909) it is claimed that toluol and CS_2 completely destroy nitrification. In subsequent publications [see Russell and Golding (10), Russell and Petherbridge (13) and Russell and Hutchinson (12)] an effort is made to correlate the destruction of the harmful factor existing in soil with the destruction of nitrifying organisms. The following quotation well illustrates this view. "The extinction of the harmful factor goes along side by side with the extinction of the living bacteria and we never get one without the other; the completeness of the process can be accurately gauged by the initial counts and by the determination of nitrates subsequently formed." However, when a careful analysis of their data is made, rather interesting results are noted. Taking the effect of toluol upon the accumulation of nitrates, as given by Russell and Hutchinson (12), the following is to be noted. Of twenty-two cases in which a comparison of the formation of nitrates free from the effect of other factors can be made, we find that the final analyses, varying from 28 to 420 days after treatment, show in twelve cases a greater gain in treated than non-treated, and in one case the same. Of these twenty-two there are five in which no nitrate determinations are recorded at the beginning of the experiment and if we eliminate these, ten of the remaining seventeen show greater gain in treated. However, if we take the sixteen instances in which a comparison can be had under 50 days after treatment, we find that in only six is the gain in treated greater than in non-treated. Of the 22 cases mentioned above in only three of treated as compared with three non-treated do we find the gain of nitrates less than five parts per million — a figure that might be taken nominally as experimental error, or representing no nitrification.

The treatment with toluol was: "In all cases it must be understood that 0.5—1 per cent of antiseptic is added to the soil except where otherwise stated and left to act for about 30 hours and then allowed to volatilize completely." However, even 4 per cent toluol did not destroy nitrification over a period of 75 days in the two instances given. From this it would seem that nitrifying organisms are not destroyed by 0.5 to 1 per cent toluol but only temporarily checked in their activity, and that in the major portion of the cases reported by Russell and Hutchinson the final results indicate a stimulative effect on the accumulation of nitrates.

Experimental.

The experimental data given below was secured using two different samples of soil, "A" and "B", as a medium. These were secured from two adjoining plots on Experiment Station Farm.

The soil is what is known as Upland Silt Loam and has the following physical composition: volatile matter 4.91 per cent, fine gravel .26 per cent, coarse sand .37 per cent, medium sand .77 per cent, fine sand 10.77 per cent, very fine sand 29.37 per cent, silt 49.55 per cent, and clay 8.88 pe rcent. The lime requirement, loss on ignition, active humus, available phosphorus, and total nitrogen of the two plots, according to Mr. C. A. LeClair, to whom the writer is indebted for the physical analysis as well as chemical, do not differ beyond experimental error. The only difference has been in the method of cropping. "A" has been sown to wheat followed by a catch crop of cow peas for a series of twelve years, while "B" has been in a corn, oat, wheat, and legume rotation for a similar length of time. Under these systems the fertility (as measured by wheat yielding power) of "B" has remained constant, while "A" has fallen to approximately one-fifth original yield. Since what are termed "sick soils" usually give a greater response to treatment with CS_2 or toluol, it was believed that soil from the plots described above should offer excellent material upon which to work.

The soil used in the experiments was collected from several points to depth of 8 inches on the respective plots and brought to the laboratory December 23, 1912. The several samples were seived to remove rocks, etc., and thoroughly mixed. At intervals water was added to prevent drying out. In setting up each experiment identical methods were employed. The equivalent of 100 gr. dry soil (dried at 110° C. for two hours) was taken, the measured quantity of chemical added and thoroughly mixed. If the chemical was not to be evaporated, the nitrogen in form of cotton seed meal (C. S. M.) or a solution of ammonium sulphate was added at the same time as chemical, then the whole transferred to a sterile, wide mouth, cotton plugged, 500 cc. bottle. The water content was made up to two-thirds saturation. If the chemical was to be evaporated, the soil was transferred to a small culture dish and placed in moist locker for three days. At the end of this time the dishes were uncovered in the laboratory and kept thus for 24 to 48 hours. By this time the soil was usually air dry and hence allvolatile toluol or CS_2 had evaporated. The nitrogen was then added, thoroughly mixed in and the whole transferred to above described bottles. Samples were always set up in duplicate. Incubation was at room temperature, 20—25° C., and at intervals the water lost by evaporation was replaced. This, however, was small since open vessels of water were kept in compartment with samples to prevent rapid drying out.

At the end of incubation period the water content was made up to 300 cc., one or two grams of calcium oxide added and thoroughly shaken (See Lipman and Sharp [17]). The bottles were then left undisturbed until the supernatent liquid became clear.

Nitrates were determined in an aliquot part of liquid by the phenol di-sulphonic acid method. In all cases duplicate determinations were made. If results varied widely additional duplicate determinations were made as a check. The figures reported are the average of the two determinations. Where reported as zero no reaction was given with diphenylamine (See Withers and Wray [17]). Where blank is left the sample was lost. Realizing the sources of error in colourmetric methods, four readings of every sample were made and the average taken as final. It is highly probable that when such large amounts of nitrates are present, as in some cases reported, the experimental error, in methods used, is very great. There are indications of such in comparing duplicates in several instances. However, this can in no wise invalidate the general results since they are so marked; neither can it discredit conclusions to be drawn.

Results.

In studying the results presented in Tables I, II, and III the following notes should be remembered. Incubation was in all cases at room temperature, 20°—25° C., and for approximately the same length of time, i. e. twenty-eight days, except the longer periods in Experiment 31. This period was selected because it is the standard for nitrification experiments in most laboratories. The chemicals were applied on a cubic centimeter basis because they were much easier to handle in this way than by weight. The strengths used (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5; 1.0 and 5.0 cc. per 100 grams of dry soil — dried at 110° C. for two hours) were not numerous enough to give accurate crucial or end points, still the variation is sufficiently wide to cover all experimental data thus far presented by other investigators.

Experiments 29 and 30 are duplicates begun at the same time, toluol being left in 29 and evaporated from 30. The same is true of 32 and 33 in which CS_2 was used. 36 and 37 are duplicates of 29 and 30 except that soil "B" was substituted for soil "A", and that they were run at different times. 38 and 39 were begun at same time 38 being a duplicate of 32 except in use of soil "B" in place of "A" and time at which experiment was run. Thirty-nine is a duplicate of 33 except in the time at which experiment was run. It was intended that 36, 37, 38, and 39 should be exact duplicates of 29, 30, 32, and 33, soil "B" being used in former and soil "A" in latter. This was carried out except in 39 where soil "A" had to be used since the supply of soil "B" was exhausted.

Experiment 31 was set up in five series of duplicates, to be analyzed at different periods of incubation, to determine whether nitrification once inhibited by the chemicals in question could ever be restored without re-inoculation. Four of these series have been analyzed and the results of the three analyses are presented in Table 3 and text figure II. The strength of chemicals, .2 cc. and 1. cc. per 100 grams soil, were used because preliminary experiments indicated that the crucial strength for short periods of incubation, lay near .2 cc. and that 1 cc. was sufficient to inhibit the process.

In all cases there was from 10 to 20 parts NO_3 per million soil when experiments were set up, hence when quantity found it less than this it is assumed that no nitrification has taken place. This is probably true when nitrogen was applied in form of $(NH_4)_2SO_4$ but not true if cotton seed meal were applied. It will be noted that where the latter was used in presence of heavy treatment with chemical, the nitrate content is often reported as zero, even when tested with diphenylamine. This is explained on the assumption that the very heavy growth of molds, occasioned in all cases by an application of cotton seed meal, assimilated all nitrates present in first few days, provided the original amount of NO_3 was not great. This same phenomenon has often been noted when analyses were made at end of seven days. Hence all nitrates found where cottonseed meal was applied probably represent nitrates formed after the experiment was begun. For nitrates formed when $(NH_4)_2SO_4$ was applied, the amount originally present must be deducted.

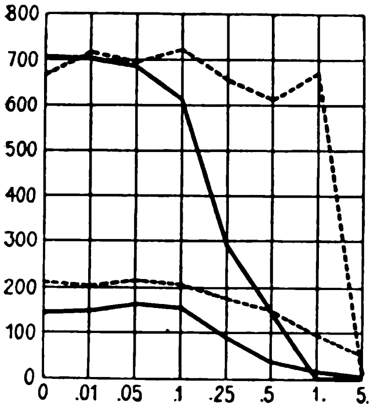


Figure I. Showing effect of toluol and CS_2 on nitrate accumulation during 28 days. Figures on abscissa = cc. chemical per 100 gr. soil. Figures on ordinate = p. p. m. NO_3 recovered. Solid lines = samples treated with toluol. Dotted lines = samples treated with CS_2 Uppe lines in presence of C. S. M. Lower lines in presence of $(NH_4)_2SO_4$.

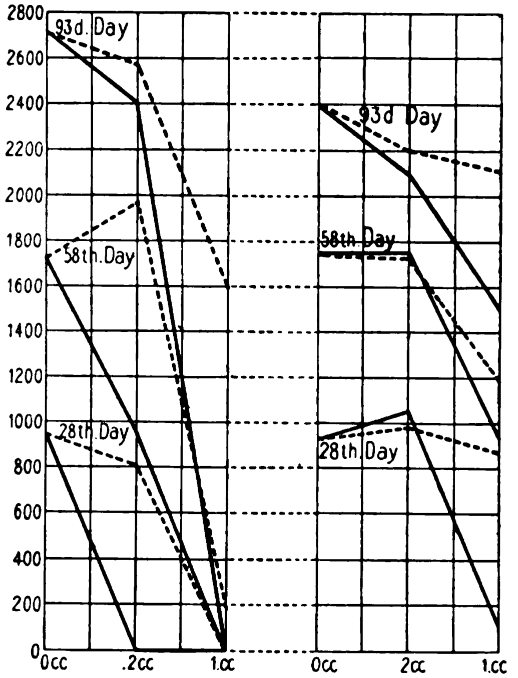


Figure II. Showing effect of toluol and CS_2 on nitrate accumulation during long incubation periods. Figures on abcissa = cc. chemical per 100 gr. soil. Figures on ordinate = p. p. m. NO_3 recovered. Solid lines = samples treated with toluol. Dotted lines = samples treated with CS_2. Right of center = samples evaporated. Left of center = sample not evaporated.

In no case was reinoculation possible for all bottles were kept stoppered with cotton and all water added was previously sterilized.

In analyzing the data secured where toluol was used it is to be noted (Exp. 29, 30, 36, and 37) that if nitrogen were added in form of cotton-seed meal, or in form of $(NH_4)_2SO_4$, no marked effect is produced upon the accumulation of nitrates until the strength exceeds .1 cc. per 100 grams soil. With less amounts the results are so variable that no definite conclusions can be drawn from the limited experimental data. Sometimes the chemical appears to stimulate, at other times to hinder the accumulation of nitrates.

If the amount, of toluol exceeds .1 cc. per 100 grams soil the effect in all cases save one (Exp. 29, .25 cc.) is to retard the accumulation of nitrates. This may be very marked even in passing from .1 cc. to .25 cc. as in Experiment 30, or more gradual as in Experiment 36. In either case nitrate accumulation falls to zero at .5 cc. if toluol is evaporated or at 1 cc. if toluol is not evaporated. (See text figure I).

Where CS_2 was used (Exp. 32, 33, 38, and 39) somewhat different results are to be noted. Where nitrogen was applied in the form of cotton-seed meal no constant effect can be noted until the strength exceeds 1 cc. per 100 grams soil. The average (see text figure I) of the four experiments, gives a slightly greater amount of nitrates up to .1 cc. with a decline at .25 cc. and .5 cc. and a second rise at 1 cc. With 5 cc. per 100 grams soil the nitrate accumulation falls almost to zero, though in one sample (Exp. 38) there was evidently nitrate formation with this heavy application.

Where nitrogen was added in form of $(NH_4)_2SO_4$ no marked constant effect can be detected up to and including .1 cc. per 100 grams soil. Beyond this there is a gradual decrease in total nitrates as the amount of chemical increases. However, there is no sudden drop even with 5 cc. per 100 grams soil. In one instance (Exp. 39, Sample A) there was very vigorous nitrate formation, even with this strong application.

When the results of Experiment 31, in which a part of the periods incubation were much longer than those just discussed, are examined very interesting and instructive figures are to be noted. It should be remenbered that in this experiment Soil "A" was used as a medium and nitrogen, 120 mg. per 100 grams soil, added in form of cotton-seed meal. And, as mentioned earlier, only .2 cc. and 1 cc. of chemical per 100 grams of soil applied.

In the series analyzed at the end of twenty-eight days, nitrate accumulation, where .2 cc. and 1. cc. toluol was added and evaporated, fell to zero. Where not evaporated the nitrate content was slightly greater in sample to which .2 cc. was added. Where 1. cc. was added the quantity of NO_3 indicated the beginning of nitrification.

From the twenty-eighth to the fifty-eighth day the gain in nitrates was almost identical in checks and in all samples to which toluol was added except the 1 cc. evaporated samples. These remained zero. From the fifty-eighth to the ninety-third day large nitrate gains were still evident in all cases except 1 cc. evaporated samples, this still remaining zero. Both non-evaporated samples showed a somewhat smaller gain than the checks, but the .2 cc. evaporated samples gave half again as large a gain as the checks. The total amount of nitrates present at this analysis was somewhat less in every case where toluol was added than in checks. The total amount and gains during the different periods are graphically shown in text figure II.

With CS_2, up to the twenty-eighth day, practically no effect seemed to be produced by .2 cc. where evaporated, or by .2 cc. and 1. cc. where not evaporated. In the 1 cc. evaporated samples inhibition was complete. From the twenty-eighth to fifty-eighth day nitrate accumulation was more vigorous by one-half in .2 cc. evaporated samples than in check. The total amount was approximately 200 p. p. m. greater. In 1 cc. evaporated samples nitrate formation had apparently just begun, the total amount being less than 200 parts per million. In non-evaporated samples the gain in .2 cc. was almost identical with gain in checks. However, only slight nitrate formation took place in 1 cc. samples. From the fifty-eigth to the ninety-third day nitrate accumulation was not nearly so great in .2 cc. evaporated samples as in checks. This can probably be explained by assuming that the soil had reached its maximum nitrate forming power and that this maximum had been reached in the samples just mentioned somewhat sooner than in checks. The fact that a later analysis showed less nitrates in practically all samples would bear out this assumption. The 1 cc. samples in which the nitrate content at beginning of this period was very low showed enormous nitrate formation — 1400 p. p. m.

A fourth series analyzed at the end of one hundred and fifty-three days showed practically the same relative nitrate content as at ninety-three days except that toluol 1 cc. not evaporated, and CS_2 1 cc. evaporated samples, were much higher. A glance at text figure II will show that these two samples were far behind others at the ninety-third day period. The total amount of nitrate the at this analysis was much less than at end of ninety-three days except in two instances mentioned. It is probable that this was due to the assimilation of nitrates by a heavy growth of molds that occurred on all samples. In the two cases where the total amount was greater, i. e. toluol 1 cc. not evaporated and CS_2 1 cc. evaporated, it will be remembered were far behind others due to delay in nitrification caused by chemicals added. There was slight indication of nitrate accumulation in one sample where 1 cc. toluol was added and evaporated, indicating a revival of nitrification.

After incubating for one-hundred and eight-one days the two 1 cc. toluol evaporated samples in the fifth series were analyzed and gave (a) 25.2 and (b) 1080 parts NO_3 per million soil. Sample a also contained 75 parts per million NO_2. In other words nitrification remained nil in such treated samples up until the one hundred and fiftieth day or later, and then became just as active as it was in checks during the first thirty days. The process did not set in quite as early in sample a as in sample a but the results indicate that nitrification was very active in both at the time of analysis. Seldom do we get an accumulation of nitrites, and when present in such quantity as found, it indicates either very rapid nitrite formation or absence of nitrate formation. In no previously analyzed samples similarly treated, or in the sample b at this time, has there been found a measurable quantity of nitrites. Hence there is no reason to believe that the nitrate organisms are more susceptible to the treatment than the nitrite organisms. This being true the two processes must have just commenced and the nitrite formation, in particular, must have been very active.

As to the difference in the effect produced upon the two different samples of soil, nothing definite is brought out. So far as can be determined from the data at hand the difference is negative. It will be noted that nitrification was in practically all cases greater in soil "A" than in soil "B"; hence, the poor condition of "A" could not be attributed to lack of nitrification.

In studying the relative effect of the chemicals when evaporated and when not evaporated the results are not sufficient to warrant any definite conclusions. Some times one condition seems to be more effective in changing nitrate accumulation; at other times the other. In the major portion of cases the samples evaporated gave a lower nitrate content. This is very

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

noticeable in comparing experiments 32 and 33, and 36 and 37. However, the .01, .05 and .1 cc. samples in 29 and 30 furnish definite exceptions to the rule. One thing seems to be rather definitely established, with regard to the effect of evaporating the chemical, that is that the amount of chemical required to inhibit the formation of nitrates is much less if it be evaporated. This is very clearly shown in Experiment 31 and also in 29 and 30. Evaporating the soil in itself, as practiced in these experiments, seemed to have no material effect on nitrate formation. One or two exceptions are to be noted but these are probably due to some other cause. However, when soil treated with a quantity of chemical, that within itself produced no detrimental effect, was allowed to evaporate, nitrification was in some cases entirely inhibited for a time. (See toluol .2 cc. and CS_2 1. cc. for the twenty-eight day period in experiment 31.) In other words the combined effect of the two processes seems to be much more detrimental than either alone. Toluol 1 cc., Experiment 31, furnishes a very striking example.

In comparing the results herein presented, with those of other investigators along this line, a remarkably close agreement is to be noted in those cases where any definite comparison is possible. Particularly is this true of the work of Coleman, and Russell and Hutchinson, provided a correct interpretation of the latter results be made. Coleman, working with CS_2 a little stronger than 1 cc. per 100 grams soil, found that nitrification was at first delayed but that after a time this detrimental effect disappeared. The same results are to be noted in Experiment 31. A careful study of the results of Russell and Hutchinson using from .5 to 1 cc. toluol per 100 grams soil show that in the major portion of cases the first effect was detrimental. With longer incubation periods this effect was usually overcome or even reversed. Experiment 31 substantiates these results.

From the results herein presented and those of previous investigators the following points seem to be clearly established.

1. The detrimental or beneficial effect of toluol or CS_2 upon nitrate accumulation in soils depends (a) upon acting strength of the chemical in question; and (b) upon whether the soil is exposed for the chemical to evaporate.

2. Toluol, in strengths approximating .1 cc. per 100 grams soil, exerts no appreciable effect upon nitrification. If the strength exceeds this it may, and usually does, exert a detrimental or even inhibitory effect upon the process for short periods of incubation. However, if the periods of incubation are extended this harmful effect, which may last as long as one hundred and fifty days, is overcome with strengths up to and including 1 cc. per 100 grams soil, the strongest tested.

3. In strengths of less than approximately 1 cc. per 100 grams soil CS_2, even for short periods of incubation, does not exert an appreciable effect upon nitrate accumulation. If the strength exceeds approximately 1 cc. per 100 grams soil, CS_2 may, and usually does, exert a temporary retarding effect which, however, is soon overcome even with as strong a treatment as 5 cc. per 100 grams soil.

4. Samples of soil treated with either chemical in sufficient quantity to entirely inhibit nitrification for a period

of four to twenty weeks may entirely recover from the effect without reinoculation.

5. So far as the results thus far reported from laboratory

Table I.

Soils Treated With Toluol.

Showing Effect of Toluol Upon Accumulation of NO_3.

Treatment	N as $(NH_4)_2$ SO_4; 60 mg. per 100 gr. soil							
	0 1)	.01 cc.	.05 cc.	.1 cc.	.25 cc.	.5 cc.	1. cc.	5. cc.
Experiment 29. Soil "A." Set up 2/1/13. Not Evaporated.								
Sample a	218 2)	97	225	240	169	65	37	
„ b	206	277	216	220	161	68	21	
Average	212	187	220.5	230	165	66.5	29	
Experiment 30. Soil "A." Set up 2/4/13. Evaporated.								
Sample a	168	240	219	204	73	0	7.46	
„ b	200	191	191	220	10	10	7.5	
Average	184	215.5	205	212	41.5	5.4	7.5	
Experiment 36. Soil "B." Set up 3/29/13. Not Evaporated.								
Sample a	120	116	111	95	95	83	17	10
„ b	126	102	180	106	82	67	23	10
Average	123	109	145.5	100.5	88.5	75	20	10
Experiment 37. Soil "B." Set up 4/3/13. Evaporated.								
Sample a	60	84.6	80	77	75	12	13.5	7.5
„ b	78	84.6	—	76	75	15	13.5	6
Average	69	84.6	80	76.5	75	13.5	13.5	6.75
Gen. Av.	147	149	163	155	92	40	17.5	8.4

Treatment	N. as C. S. M. 60 mg. per 100 gr. soil.							
	0	.01 cc.	.05 cc.	.1 cc.	.25 cc.	.5 cc.	1. cc.	5. cc.
Experiment 29 (Continued).								
Sample a	675	592	696	485	600	146	0	
„ b	675	708	675	480	496	332	0	
Average	675	650	685.5	482.5	548	239	0	
Experiment 30 (Continued).								
Sample a	1000	1108	900	1108	50	0	0	
„ b	1005	982	939	800	74	0	0	
Average	1002	1045	919.5	954	62	0	0	
Experiment 36 (Continued).								
Sample a	440	450	450	424	300	257	0	0
„ b	420	360	450	379	225	184	0	0
Average	430	405	450	401.5	262.5	220.5	0	0
Experiment 37 (Continued).								
Sample a	No nitrification in any samples.							
„ b								
Average								
Gen. Av.	702	700	685	613	291	153	0	0

---

1) 0, .01 cc. etc. = cubic centermeters toluol per 100 grams dry soil.

2) Figures = parts per million NO_3 in dry soil.

To convert figures into mg. NO_3 per 100 grams soil divide by 10.

experimentation can be applied to experimental field practice, it would seem that neither toluol or CS_2, as previously used, could materially effect nitrate accumulation since

Table II.
Soils Treated With CS_2.
Showing Effect of CS_2 upon Accumulation of NO_3.

Treatment	N. as $(NH_4)_2$ SO_4. 60 mg. per 100 gr. Soil.							
	0[1]	.01 cc.	.05 cc.	.1 cc.	.25 cc.	.5 cc.	1. cc.	5. cc.
Experiment 32. Soil "A." Set up 2/7/13. Not Evaporated.								
Sample a	224[2]	257	210	176	161	114	90	
„ b	228	222	220	210	166	100	60	
Average	226	239.5	215	193	163.5	107	75	
Experiment 33. Soil "A." Set up 2/11/13. Evaporated.								
Sample a	216	214	258	230	230	245	85	
„ b	230	247	261	187	—	166	—	
Average	223	230.5	259.5	258.5	230	205.5	86	
Experiment 38. Soil "B." Set up 4/5/13. Not Evaporated.								
Sample a	132	150	124	137	129	118	74	15
„ b	133	123	152	134	100	117	84	15.6
Average	132.5	136.5	138	135.5	114.5	117.5	78	15.3
Experiment 39. Soil "A." Set up 4/17/13. Evaporated.								
Sample a	273	200	273	245	204	168	156	175
„ b	258	214	245	222	207	188	136	0
Average	265.5	207	259	234.5	205.5	178	146	87.5
Gen. Av.	212	203	218	205	178	152	96	51

Treatment	N. as C. S. M. 60 mg. per 100 gr. soil.							
	0	.01 cc.	.05 cc.	.1 cc.	.25 cc.	.5 cc.	1. cc.	5. cc.
Experiment 32 (Continued).								
Sample a	727	800	675	727	906	706	640	
„ b	774	676	750	728	750	762	485	
Average	750.5	738	712.5	727.5	828	734	562.5	
Experiment 33 (Continued).								
Sample a	632	940	615	706	558	615	600	
„ b	787	600	615	—	—	667	842	
Average	709.5	770	615	706	558	641	721	
Experiment 38 (Continued).								
Sample a	474	492	600	686	600	436	800	0
„ b	486	600	600	600	600	600	738	50.7
Average	480	546	600	643	600	518	769	25.3
Experiment 39 (Continued).								
Sample a	695	787	750	900	632	624	666	0
„ b	750	829	900	716	632	500	600	0
Average	722.5	808	825	808	632	562	633	0
Gen. Av.	666	716	698	721	655	614	671	13

---

[1] 0, .01 cc. etc. = cubic centemeters CS_2 per 100 gr. dry soil.

[2] Figures = parts per million of NO_3 in dry soil.

To convert figures into mg. NO_3 per 100 gr. soil divide by 10.

Table III.

Soil Treated With CS_2 and Toluol.

Showing Effect of Toluol and CS_2 upon Accumulation of NO_3 Incubation Period Varied.
Experiment 31. Soil "A." Set up 2—5—'13.

Treatment		CS_2					
		Evaporated			Not Evaporated		
		0[1])	.2 cc.	1. cc.	0	.2 cc.	1. cc.
Analyzed	a	923[2])	695	0	905	958	750
3/5/13	b	958	923	0	941	1000	1000
	av.	941	809	0	923	979	875
	a	1570	1963	143	1543	1600	1140
4/4/13	b	1878	1963	240	1963	1878	1234
	av.	1724	1963	191	1753	1739	1192
	a	2953	2400	1606	2400	1829	2400
5/9/13	b	2477	2742	1372	2400	2559	1829
	av.	2715	2571	1489	2400	2194	2114

Treatment		Toluol					
		Evaporated			Not Evaporated		
		0	.2 cc.	1. cc.	0	.2 cc.	1. cc.
Analyzed	a	923	0	0	905	1143	205
3/5/13	b	958	0	0	941	958	18
	av.	941	0	0	923	1051	111
	a	1570	1056	0	1543	1728	864
4/4/13	b	1878	900	0	1963	1744	1016
	av.	1724	978	0	1753	1736	940
	a	2953	2400	0	2400	1820	1500
5/9/13	b	2477	2400	0	2400	2400	1500
	av.	2715	2400	0	2400	2110	1500

practical applications rarely ever exceed approximately .1 cc. per 100 grams soil.

Literature.

1. Brailles, Rev. de Viticult. T. 4. 1895. p. 302—307.
2. Coleman, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. p. 484—513.
3. Heinze, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 329—358; Bd. 18. 1907. p. 56—74, 246—264, 462—470, 624—634, 790—798.
4. Hiltner u. Störmer, Arb. d. k. biol. Anst. f. Land- u. Forstw. Bd. 3. 1903. p. 445—528.
5. Krüger u. Heinze, Landw. Jahrb. Bd. 36. 1907. p. 383—423.
6. Lipman, Rpt. Soil Chem. and Bact. N. J. Exp. Stat. 1907. p. 170—186.
7. Lipman a. Sharp, U. of Cal. Pub. in Agr. Sc. Vol. 1. 1912. p. 21—37.
8. Pagnoul, Ann. Agron. T. 20. 1895. p. 497—501.
9. Perraud, Rev. Intern. de Vit. et Oenol. T. 1. 1894. p. 307—315.
10. Russell a. Golding, Journ. Agr. Sc. Vol. 5. 1912. p. 27—47.
11. Russell a. Hutchinson, Journ. Agr. Sc. Vol. 3. 1909. p. 111—114.
12. Russell a. Hutchinson, Journ. Agr. Sc. Vol. 5. 1913. p. 152—221.
13. Russell a. Petherbridge, Journ. Agr. Sc. Vol. 5. 1912. p. 86—111.
14. Scherp, Arb. d. k. biol. Anst. f. Land- u. Forstw. Bd. 7. 1909. p. 353—428.
15. Störmer, Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. Bd. 5. 1907. p. 113—131.
16. Warrington, Journ. Chem. Soc. (London). Vol. 45. 1878. p. 637—672.
17. Withers a. Wray, N. C. Stat. Rpt. 1910. p. 56—58.

---

[1]) Figures = cc. chemical per 100 grams soil.

[2]) Figures = parts per million NO_3 in dry soil.

To convert figures into mg. NO_3 per 100 gr. soil divide by 10.

Nachdruck verboten.

Studies on Soil Protozoa.

I. The Growth of Protozoa on various Media and the Effect of Heat on active and encysted Forms.

[From the Laboratorium für Bakteriologie am Landwirtschaftlichen Institut der Universität Leipzig.]

By **Andrew Cunningham** B. Sc. (Edin.) and Dr. **F. Löhnis.**

I. Introduction.

In recent years much attention has been devoted to the effects of partial sterilisation of soils by heat and antiseptics, on the production of plant food. In this connection we are particularly indebted to the work of Russell and Hutchinson[1]) for insistence on the importance in the soil of a group of organisms, other than the bacteria, viz: the protozoa. The latter are regarded by the authors mentioned as being powerful factors in limiting the numbers and activity of bacteria in ordinary soils. But, as they are less resistant than the bacteria, they are killed or at least suppressed by partial sterilisation and the bacteria surviving are allowed to multiply to a greater extent than previously.

The question of the importance of soil protozoa is, by no means, a new one. As long ago as 1837 G. Chr. Ehrenberg[2]) noted the occurrence of infusoria in large numbers in rich soil. Greef[3]) (1866) described several species of amoebae etc. from soil, although nothing is said with regard to their function. In 1869 v. Rosenberg-Lipinsky[4]) also referred to the occurrence of infusoria in soil and considered that they are probably of importance in regard to soil fertility. The first reference to the special function of soil protozoa is contained in a paper by Bréal[5]), published in 1896. He found Colpidium active in the decomposition of plant constituents in soils, with production of ammonia. The remaining references to this subject are all of recent date. Emmerich, Graf zu Leiningen and O. Loew[6]) as well as Francé[7]) believe that the soil protozoa are harmful factors, while M. Wolff[8]) gives the following summary of their activities:

1. The transport of disease producers.
2. Prevention, by utilisation, of the sinking of valuable manurial substances into the deeper layers.
3. The killing of algae, fungi and bacteria.

When, therefore, one considers the very varied and important nature of the functions which have been attributed to the soil protozoa, it at once appears probable that they might very profitably receive further attention.

The investigations described in this and subsequent papers were undertaken with a view to determining, if possible, whether protozoa lead an active life in soil and, if so, the conditions governing their activity. Later, it is intended to study the interaction of protozoa and bacteria in soil and in solution. The work described in this paper is all more or less of a preliminary nature. In the first place, it was thought advisable to make a general survey of the various solutions used as media for the cultivation of bacteria from soil, in order to determine which are the most suitable for the development of the protozoa. Next the dilution method for counting protozoa was tried but the usual difficulty in distinguishing active from encysted forms was experienced. It was, therefore, necessary, before proceeding further with the dilution method, to devise some means of distinguishing cysts from active forms and so the work described in part III of this paper was undertaken.

---

[1]) Journ. of Agric. Sc. III. 2. 1909. p. 111 and Journ. of Agric. Sc. V. 2. 1913. p. 152.

[2]) Die fossilen Infusorien und die lebendige Dammerde 1837.

[3]) Arch. f. mikrosk. Anat. 1866. 2. p. 299.

[4]) Der prakt. Ackerbau. 3. Aufl. 1869. Bd. 2. p. 27.

[5]) Ann. agron. 22. 1896. p. 362 (ref. Zentralbl. f. Agr. Chem. 26. p. 210).

[6]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. p. 466.

[7]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 1.

[8]) Mitt. a. d. Kaiser Wilhelm-Institut f. Landw. Bromberg. Bd .1. 1909. p. 382 (ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 24. 1909. p. 465).

II. Survey of Bacterial Solutions.

Hay infusion has been very extensively used in work on the protozoa. Goodey[1]) in his work on the soil protozoa employed a 1 per cent hay infusion made slightly alkaline to litmus. He also used soil extract. Frosch[2]) and Martin[3]) have employed agar plates for cultivation of protozoa from soil. The occurrence of protozoa in the solutions used for cultivation of soil bacteria has only been recorded in a very few instances. Beijerinck[4]), Wolff[5]), Emmerich, Graf zu Leiningen and Loew[6]) and Killer[7]) have noted the occurrence of protozoa in association with Azotobacter. The last named also observed protozoa in peptone and Giltay solutions. Beijerinck[8]) has, further, described an amoeba which he found in association with the nitrifying bacteria and which he cultivated on agar and silica plates.

For this section of the work the solutions mentioned, after sterilisation, were inoculated with soil, incubated at the temperatures noted and examined microscopically every two days for a month. The species of protozoa, occurring in greatest numbers have been identified as far as possible. It is not claimed, however, that the lists of species given are in any sense exhaustive, because, in most cases, only single samples of soil have been examined. Further, no attempt has been made to identify the amoebae owing to the difficulties involved in such work (see Goodey's paper).

1. Ammonifying Solutions.

a) 1 per cent Bloodmeal + .05 per cent K_2HPO_4 in tap water. Incubated at 22° C. In two days flagellates were observed in this solution and in four days ciliates also. The active flagellates, however, soon began to decrease in numbers and finally disappeared. After 14 days the ciliates were mostly encysted and amoebae appeared but were never numerous. About the 24th day a general revival took place: ciliates, flagellates and amoebae were observed in larger numbers than formerly. The flagellate and amoebae soon encysted; the ciliates continued for some time in the active form.

---

[1]) Proc. Roy. Soc. London. [B]. Vol. 84. 1911. p. 165.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 21. 1897. p. 926.

[3]) Proc. Roy. Soc. London. [B]. Vol. 85. 1912. p. 393.

[4]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 570.

[5]) Loc. cit.

[6]) Loc. cit.

[7]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. p. 521.

[8]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 19. p. 257.

Species found. Flagellates: Oicomonas termo (Ehrb.), Oicomonas Dallingeri (Kent), Monas vivipara (Ehrb.), Prowazekia terricola (Martin), Cyathomonas truncata (Fresen).

Ciliates: Colpidium colpoda (Ehrb.), Colpoda cucullus (O. F. M.), C. steinii (Maupas), Oxytrichia Pellionella (O. F. M.), Enchelys sp.

Amoebae sp. In addition a monothalamous form was observed (not identified).

Although all three common forms of protozoa develop in this medium, the flagellates and amoebae are always somewhat scarce. There is generally a considerable number of flagellates at the start but these appear to be early suppressed by the ciliates.

At 30° C bloodmeal solutions give in a short time a great development of ciliates, few or no flagellates and amoebae are observed at this temperature. This medium at 30° C is therefore an excellent one for the cultivation of ciliates. In bloodmeal solutions at 38° C a few amoebae only were observed.

b) Hornmeal and Fleshmeal solutions gave very similar results to those obtained with Bloodmeal. Fleshmeal, however, gave a rather better development of protozoa than did Hornmeal or Bloodmeal.

c) 1 per cent Peptone solution + .05 per cent K_2HPO_4. In this no protozoa have ever been obtained, doubtless due to the high concentration. In .1 per cent peptone + K_2HPO_4 solution protozoa were found on one occasion only.

2. Nitrifying Solution.

.The Winogradsky-Omelianski solution with .1 per cent instead of .2 per cent Ammonium sulphate was employed, inoculated with soil and incubated at 22° C. No protozoa were observed till 12 days had elapsed when a few flagellates, ciliates and small amoebae appeared. These were never numerous and disappeared again in a few days. On the 22nd day a few amoebae similar to those described by Beijerinck were seen. They increased in numbers till about the 34th day, when the solution ceased to give a reaction to Nessler's reagent. The amoebae, which were now quite numerous, continued in the active form for a few days longer when they all encysted.

The amoebae found in nitrifying solutions appear to be associated with the first group of the nitrifying organisms as they have not been observed in the sodium nitrite solutions, generally used for cultivation of Nitrobacter. Further, considering the purely mineral nature of the medium and also the course of development of the protozoa, there seems to be little doubt that the latter feed upon the bacteria present.

As a medium for cultivation of soil protozoa, the nitrifying solution is not of great value as only one species of amoeba develops to any great extent: the development is also very slow. At 30° C amoebae appear in a much shorter time but they are never so numerous as at 22° C.

3. Denitrifying Solution (Giltay).

a) At 22° C . In 4 days flagellates and a few ciliates appeared and increased in numbers till the 6th day. On the 12th day all were encysted. Occasionally after this a few active forms were found. On the 24th day a few amoebae were observed. This is essentially a flagellate medium: ciliates are ever nearly so numerous. It will also be observed that it gives a very rapid development (within about 6 days the maximum is reached). In this connection it is interesting to note that the development of the protozoa is again roughly parallel with the growth of the bacteria.

Species found. Flagellates: Monas guttula (Ehrb.), Oicomonas Dallingeri (Kent), Bodo angustatus (Duj.).
Ciliates: Colpidium colpoda (Ehrb.). Amoebae (sp.).

b) At 38° C. No protozoa were observed in this medium.

4. Azotobacter Media

at 22° C. a) 1 per cent Mannite + .05 per cent K_2HPO_4 in soil extract. In 4 days there was an abundant development of Azotobacter with a few flagellates. The latter, however, never multiplied to any great extent. Ciliates appeared on the 6th day and increased in numbers for some time. They began to encyst about the 24th day, although a few remained active till the end of the observation period. Amoebae were seen from the 20th day onwards.

Species found. Ciliates: Colpidium colpoda (Ehrb.), Enchelys (sp.) and Oxytrichia Pellionella (O. F. M.). Amoeba (sp.).

b) 2 per cent Calcium malate + .05 per cent K_2HPO_4 in tap water. The development on this medium was very similar to that on mannite. Oxytrichia and Enchelys, however, were not found and the amoebae appeared on the 14th day.

The mannite and calcium malate solutions gave considerable numbers of ciliates, although they were not outstanding in this respect. The presence of a thick surface film of Azotobacter, too, was found rather inconvenient for microscoping purposes.

A number of mannite solutions, in which Azotobacter had been displaced by the butyric acid bacteria, were examined. In only one of these could any traces of protozoa be found, and the latter were all in an encysted condition. The presence, therefore, of any considerable quantity of butyric acid would seem to be inimicable to the activity of protozoa.

5. Urea Solution

at 22° C. A 5 per cent urea solution with .05 per cent K_2HPO_4 in soil extract showed no protozoa, doubtless due to the great evolution of ammonia which took place.

6. Cyanamide Solution

at 22° C. This solution contained: Soil extract 100 c. c., Calcium cyanamide .2 gm., K_2HPO_4 .05 gm., Asparagin .01 gm., Glucose .01 gm. In the first solution examined no protozoa were found. Later, however, ciliates, flagellates and amoebae have been observed in cyanamide solutions after 20 days but never in sufficient numbers to justify the selection of the medium for cultivation of protozoa.

7. Solution for Cellulose Decomposition (Omeliansky).

a) At 22° C. A few flagellates and ciliates were obtained in this solution after 4 days, but no very characteristic fauna appeared until about the 18th day. Then a number of large amoebae was observed for about 8 days. This species of amoeba is much larger than any of the others seen. On the

20th day a great development of ciliates had taken place. The latter continued in the active form till about the 38th day when they began to encyst. On the 32nd day small amoebae appeared in great numbers associated with a darkening of the solution and active decomposition of the cellulose. They had just begun to encyst at the end of the period of observation.

This medium shows very markedly the development of protozoa running parallel with that of the bacteria. Up to the 20th day few protozoa were seen. After this, however, the cellulose decomposing organisms began to multiply and with them ciliates. The decomposition became most active about the 32nd day when enormous numbers of amoebae appeared. The medium shows a great development of protozoa, chiefly ciliates and amoebae. But it is too slow for general use in the cultivation of these organisms.

Species found. Ciliates: Colpoda cucullus (O. F. M.), C. steinii (Maupas), Colpidium colpoda (Ehrb.), Enchelys (sp.). Amoebae of 2 species.

b) At 38° C. In this solution only ciliates have been observed. These appeared after about eight days incubation and continued in active form till the end of the observation period. They never became very numerous, however, so that the medium does not appear specially suitable for cultivation of ciliates from soil.

Species found: Colpidium colpoda (Ehrb.), Balantiophorus elongatus.

8. Other Media.

In addition to these solutions employed for cultivation of bacteria, protozoa have been observed on a number of other media:

a) 1 per cent Mannite + .05 per cent K_2HPO_4 in soil extract with the addition of chalk, inoculated with B. fluorescens and incubated at 22° C. has given a greater and more rapid development of ciliates and amoebae than any other medium yet examined.

b) Flagellates and ciliates have been found in considerable numbers in hanging drop preparations made from aerobic cultures of the cellulose organisms on filter paper + K_2HPO_4 + $MgNH_4PO_4$ incubated at 30° C.

c) In soil extract + .05 per cent K_2HPO_4 incubated at 22° C all the species of ciliates named in the foregoing survey and two monothalamous forms in addition have been found after 4—5 weeks incubation. They did not, however, occur in large numbers.

d) Lastly amoebae have been observed on soil extract + K_2HPO_4 agar plates.

Summary.

Probably the most striking feature of the results brought out by the survey of media is the close connection between the development of the protozoa and that of the bacteria as already referred to. This relationship is shown more clearly in the following Table 1 in which the periods of maximum activity of protozoa and bacteria are compared.

In each case it will be seen that the maxima correspond very closely. This can be accounted for by supposing, either that the protozoa live upon the bacteria, or that the protozoa are active agents in the decompositions taking place. The former is the more probable view, however. It is supported by the fact that in most cases the protozoal activity lags slightly behind that of the bacteria: this is particularly marked in the case of the nitrifying solution in which complete encystment of the amoebae did not take place for some days after the ammonia had disappeared.

Table 1.

Medium	Maximum activity of Protozoa	Maximum activity of bacteria
Bloodmeal solution at 22° C	24th—30th day	20th—30th day
Nitrifying solution at 22° C	28th—38th „	25th—35th „
Giltay solution at 22° C	6th—8th „	4th—8th „
Mannite solution at 22° C	10th—24th „	10th—20th „
Cellulose solution at 22° C	32nd—38th „	32nd—38th „

It is, further, important to note that whether the activity of protozoa is directed to checking that of the bacteria or to aiding it, they exist in such numbers in ammonifying solutions, at all events, that they are bound to exercise an influence upon the results obtained in quantitative work on ammonification in solution.

In the majority of the solutions examined there can be traced a general sequence in the development of the various groups of protozoa. In most cases flagellates are the first protozoa to appear. These are generally followed almost immediately by the ciliates in the presence of which the flagellates do not appear to flourish. After a more or less prolonged period of activity the ciliates encyst and the Amoebae appear. The latter seem to flourish best in a medium in which there are few or no actively motile protozoa. The first appearance of flagellates, ciliates and amoeba in the various solutions is shown in Table 2:

Table 2.

Medium	First appearance of active:		
	Flagellates (days)	Ciliates (days)	Amoebae (days)
Bloodmeal solution (22° C)	2.	4.	14.
Giltay solution (22° C)	4.	4.	24.
Mannite solution (22° C)	4.	6.	20.
Cellulose solution (22° C)	4.	4.	18.

The most satisfactory of the media reviewed above are:

(1) Bloodmeal solution at 22° C — for flagellates in the early stages; later for ciliates.

(2) Bloodmeal solution at 30° C for ciliates.

(3) Giltay solution at 22° C for flagellates.

(4) Soil extract + K_2HPO_4 at 22° C for all three types but chiefly for flagellates and ciliates.

(5) Mannite solution + chalk inoculated with B. fluorescens, incubated at 22° C for ciliates and amoebae.

No satisfactory medium has been found which favours chiefly or entirely the development of amoebae. This is rather unfortunate as the latter appear to be extremely sensitive to the presence of the other groups of protozoa.

It was thought when the survey of media was undertaken that it might throw some light on the association of certain protozoa with definite species or groups of species of bacteria. This expectation has not, however, been realised except in the case of the amoeba present in the nitrifying solution. This is all the more remarkable in that several investigators[1]) have observed that certain species of protozoa, with which they worked, have shown a preference for certain definite species of bacteria[2]). In the observations described above, practically the same fauna has been found in each of the solutions examined. It must be remembered, however, that some of the solutions encourage the development of a great variety of species of bacteria and that a species may occur in considerable numbers in two or more solutions: for example certain strains of B. fluorescens are active as ammonifiers while others flourish in the denitrifying solution. Further it is possible that some of the protozoa found in all the solutions were living upon the mixed flora added with the soil used for inoculation.

III. Effect of Heat on Active and Encysted Protozoa.

As stated above, one of the first difficulties with which we are confronted in attempting to estimate the numbers of protozoa in soils by the dilution method is that of distinguishing cysts from active organisms. In the dilution method the soil is, of course, brought into a fluid medium and encysted and active protozoa (if present) have practically equal opportunities for development. It is, thus, impossible to say whether the protozoa found in the fluid media used have come from cysts or existed in the soil in an active form. But, as it is not conceivable that encysted organisms can be concerned in the destruction of bacteria etc. it is a matter of the utmost importance to be able to distinguish cysts from active forms.

So far as could be ascertained three methods have been described, for distinguishing active and encysted protozoa in soils. Francé[3]) rubbed up the soil with a small quantity of water and examined it directly under the microscope. This method has also been tested here, but the dilutions which it was necessary to employ were so opaque that it was impossible to see anything in them under the microscope. The remaining two methods (Thermotaxis and Galvanotaxis) have been made use of by Goodey[4]). The former did not however, give good results: the latter was applied to the study of the ciliates, and, as a result, the conclusion was arrived at, that these organisms exist in soil only in an encysted condition. The galvanotactic method has not so far been applied to the flagellates and amoebae, doubtless due to the difficulties involved in the microscopic examination of thick layers of liquid for such small organisms.

From what has been said it may be concluded that none of the methods described has proved entirely satisfactory. It was thus necessary to devise a new method and with this object in view a study of the effect of heat upon active and encysted protozoa was undertaken. When one considers the great service which a knowledge of the heat resistance of spores and vegetative forms has rendered in bacteriological work (for example in regard to the separation of species etc.), one is all the more readily convinced of the value of having similar data for the Protozoa.

---

[1]) Frosch, loc. cit.

[2]) Tischutkin, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 3. 1897. p. 185.

[3]) Loc. cit.

[4]) Loc. cit.

A considerable amount of work has already been done on the effect of heat on free living, active protozoa. Thus, for example, Doflein[1]) says that Amoeba terricola (Greef) grows best at a temperature of 10—18° C but is killed after some hours at 25° C (Grosse-Allermann). On the other hand, Infusoria have been found in hot springs up to a temperature of 64° C. There is thus as in the case of the bacteria a great variation in the behaviour of active protozoa towards heat. The work on the effect of high temperatures on cysts does not appear to have been quite so extensive. Zaubitzer[2]) found that the cysts of an amoeba from straw infusion were killed by exposure to a temperature of 50° C for 15 minutes. Wolff (loc. cit.) says that Dallinger found that the cysts of a flagellate resisted a dry heat of 120—130° C. With regard to the soil protozoa two references have been found. Meunier[3]) in 1865 found that encysted Colpodae were killed by a temperature of 100° C, while Tsujitani[4]) says that heating for 10 minutes at 60° C destroyed the cysts of a soil amoeba with which he worked.

1. Effect of Heat upon Cysts.

As a preliminary experiment 1 per cent Hornmeal + .05 per cent K_2HPO_4 in tap water was put up in quantities of 10 c. c. in small flasks, each of which was inoculated with 1 gram of soil and heated, the temperatures employed ranging from 50°—100° C. The flasks were incubated at 22° C — except where otherwise stated this is the incubation temperature employed all through this section — and their contents examined microscopically at intervals. After 15 days flagellates, ciliates and amoebae had been found in the flask which was heated to 60° C but no protozoa had appeared in that which had been heated to 70° C. The flasks were kept for 60 days: on the 35th day about 10 c. c. of a 1 per cent Bloodmeal + K_2HPO_4 solution was added to each but no further development took place.

The thermal death point of the protozoa which grow in these ammonifying solutions appears, therefore, to be under 70° C. The remainder of the work was confined to temperatures in the neighbourhood of 60—70° C and in each case the media were heated to the temperatures stated and then immediately allowed to cool.

The supply of cysts has been obtained either from old cultures of protozoa or from soil. In either case it is inevitable that a large number and great variety of bacteria is introduced with the cysts into the cultures used in these experiments and, as many of the common non-sporing bacteria are killed by the temperatures employed, there are necessarily great differences in the bacterial flora of the various cultures. Thus in some peptone cultures which were used early in the investigation all the solutions up to and including that heated to 62° C showed marked fluorescence while in those heated to higher temperatures fluorescence was absent. So, in order to ensure that the cultures heated to the various temperatures should contain

---

[1]) Lehrbuch der Protozoenkunde 1909. p. 319.

[2]) Arch. f. Hyg. Bd. 40. 1901. p. 103.

[3]) Compt. rend. T. 61. 1865.

[4]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 24. 1898. p. 666.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

as nearly as possible, the same flora, they were incubated for some days with B. mycoides before the cysts were added and heat was applied.

For convenience the results will be discussed under three heads — flagellates, ciliates and amoebae — although in some cases the development in a particular medium was not confined to one group.

a) Flagellates. The first medium employed here was .5 per cent Bloodmeal + K_2HPO_4 solution. The development was most irregular as is shown in Table 3:

Table 3.

Temperature to which heated °C	.5 % Bloodmeal (filtered) + .05 % K_2HPO_4 in test tubes, incubated 5 days with B. mycoides, inoculated with cysts from old culture and heated				.5 % Bloodmeal (unfiltered) + .05 % K_2PHO_4 in flasks, incubated 3 days with B. mycoides, inoculated with soil and heated	
	I. Incubated 20 days at 22° C		II. Incubated 20 days at 22° C		III. Incubated 20 days at 22° C	
	A.	B.	A.	B.	A.	B.
58°	+	—				
60°	—	—	—	—	+	+
62°	—	—	—	—	—	+
64°	—	+	—	—	—	—
66°	—	—	—	—	—	+
68°	—	—	—	—	—	—
70°			—	—	—	—

In the three series of cultures examined flagellates were found only in six cultures and these were most irregularly distributed as regards the temperatures. It seemed probable therefore that for some reason or other the excystation had been retarded. Something essential to the development of the protozoa had been removed or destroyed by the heat. A bloodmeal culture showing numerous active flagellates and ciliates was, therefore, taken and a protozoa-free culture of bacteria prepared from it. This was accomplished by examining small droplets of the liquid on coverglasses in a moist chamber and selecting those which contained no protozoa for inoculation into fresh, sterile bloodmeal solution. The cultures used in experiment II (see above) received on the 22nd day each a loopful of this protozoa free culture and on the 30th day a further inoculation of about 1 c. c. of the same. On the 20th day some fresh bloodmeal + K_2HPO_4 solution was added to the cultures in experiment III and each was inoculated from the protozoa free culture. Series I and II were then incubated for a further period of 35 days and series III for 40 days. The following are the results for the whole period, of incubation (Table 4).

It will be observed that the untreated series (I) showed no development on further incubation. A considerable advance, however, was made by series II and III, particularly the former. But the development is not yet quite regular although a considerable improvement is to be noted. It should be emphasised that in series II where a large inoculation of protozoa-free culture was given the development of protozoa was better than in series III where the inoculation was small. The effect of the protozoa-free culture is a point which will require further investigation, however.

Table 4.

Temperature ° C	Series I		Series II		Series III	
	A.	B.	A.	B.	A.	B.
58°	+	—				
60°	—	—	+	+	+	+
62°	—	—	+	+	—	+
64°	—	+	—	—	—	—
66°	—	—	+	+	+	+
68°	—	—	—	—	—	+
70°			—	—	—	—

Soil extract + K_2HPO_4 was next used as a medium. The effect of heat on the flagellates growing in this medium is shown in Table 5:

Table 5.

Temperature to which heated ° C	I. Soil extract + .05 % K_2HPO_4 in test tubes, incubated 2 days with B. mycoides, incubated with cysts from old culture Incubation period 35 days		II. Soil extract + .05 % K_2HPO_4 in flasks, incubated 3 days with B. mycoides, inoculated with soil Incubation period 30 days	
	A.	B.	A.	B.
60°	+	+	+	+
62°	+	+	+	+
64°	+	—	+	+
66°	+	+	+	+
68°	+	+	+	+
70°	—	—	—	—
72°	—	—	—	—

Here the development is much more regular than on the bloodmeal solution and in both series stops quite sharply at 68° C. The cultures were further incubated for a period of 25 days at 30° C after addition of some fresh sterile soil extract + K_2HPO_4 and chalk. No additional development took place, however. 70° C appears to be the thermal death point of the cysts of flagellates which develop on soil extract.

Giltay solution has been used in four series of experiments the results of which are as follows (Table 6).

Considering series I and II it is fairly clear, inspite of some irregularity in no. II that the thermal death point of the flagellates dealt with is in the neighbourhood of 70° C. Series III and IV, however, appear to support the view that these protozoa cannot resist such high temperatures: in fact they agree fairly well in showing the death point to be about 64° C. In both series, however, soil has been used in test-tubes and as in these it is kept in a much more compact mass than in flasks it naturally cools slowly. It is exceedingly probable, therefore, that the lower resistance of flagellate cysts brought out by series III and IV is due to this fact.

On the 21st day the cultures in series I, II and III received each 1 c. c. of a protozoa free Giltay solution and were incubated for 25 days longer. No further development took place during this latter period. It should also be mentioned that in the case of series IV, which received an inoculation of protozoa-free culture immediately after the heating, the effect was not to hasten but to retard development by at least 12 days. The use of protozoa-free culture with Giltay solution has not proved satisfactory.

Table 6.

Temperature to which heated ° C	Giltay solution in test tubes, incubated 3 days with B. mycoides						Giltay solution in test tubes, incubated with soil and heated. Inoculated with 1 cc. protozoa-free culture	
	Inoculated with cysts from old culture				Inoculated with soil			
	Incubated 20 days		Incubated 20 days		Incubated 20 days		Incubated 30 days	
	A.	B.	A.	B.	A.	B.	A.	B.
60°	+	+	+	+	+	+	+	+
62°	+	+	+	+	+	+	+	—
64°	+	+	+	—	—	—	—	—
66°	+	+	—	—	—	—	—	—
68°	+	+	+	+	—	—	—	—
70°	—	—	+	—	+	—	—	—
72°					—	—	—	—

b) Ciliates. The media used for the study of the effect of heat on ciliate cysts were soil extract and bloodmeal solution each with addition of .05 per cent K_2HPO_4. The results obtained with soil extract were as follows (Table 7):

Table 7.

Temperature to which heated ° C	I. Soil extract + .05 % K_2HPO_4 in test tubes, inculated 2 days with B. mycoides, inoculated with cysts from old culture		II. Soil extract + .05 % K_2HPO_4 in flasks, incubated 3 days with B. mycoides, inoculated with soil	
	Incubation period 35 days		Incubation period 30 days	
	A.	B.	A.	B.
60°	+	+	—	—
62°	+	+	—	—
64°	—	—	—	+
66°	—	—	—	—
68°	+	—	—	—
70°	—	—	—	—
72°	—	—	—	—

The results obtained in these experiments are very irregular and it is quite impossible to draw any definite conclusions from them. Both series were incubated for a further period of 25 days at 30° C after addition of a little fresh sterile soil extract + K_2HPO_4 and chalk but during that time ciliates appeared only in one culture (series I, 66° B).

The results in the case of the bloodmeal cultures are given in Table 8:

Table 8.

Temperature to which heated ° C	.5 % Bloodmeal (filtered) + .05 % K_2HPO_4 in test tubes incubated 5 days with B. mycoides, inoculated with cysts from old culture				.5 % Bloodmeal (unfiltered) + .05 % K_2HPO_4 in flasks incubated 3days with B. mycoides inoculated with soil	
	I. Incubated 20 days		II. Incubated 20 days		III. Incubated 20 days	
	A.	B.	A.	B.	A.	B.
58°	+	+				
60°	—	+	+	—	—	—
62°	—	—	—	—	—	—
64°	—	+	—	—	—	—
66°	—	—	—	—	—	—
68°	—	—	—	—	—	—
70°			—	—	—	—

These results are quite as unsatisfactory as in the case of the soil extract cultures. The method of inoculation with protozoa-free culture has, however, met with greater success here than in the former experiments. Series I was left untreated: series II received a small inoculation of protozoa-free culture on the 22nd day and a larger one (1 c. c.) on the 30th day: on the 20th day series III had some sterile bloodmeal solution + K_2HPO_4 added and also a small inoculation of protozoa-free bloodmeal culture. I and II were incubated for 35 days and III for 40 days longer. Table 9 gives the results for the whole period of incubation.

Table 9.

Temperature to which heated ° C	Series I		Series II		Series III	
	A.	B.	A.	B.	A.	B.
58°	+	+				
60°	—	+	+	+	—	—
62°	—	—	+	+	—	—
64°	—	+	—	—	—	—
66°	—	—	+	+	—	—
68°	—	+	+	+	—	—
70°			—	+	—	—

As a result of the prolonged incubation period the cultures in series I changed in only one instance. On the other hand quite a marked advance took place during this second period in the case of series II cultures. Series III however showed no change: the small inoculation, as in the case of the flagellates does not appear to have been sufficient.

In order to obtain some confirmation of the results of series II another series was started. 1 per cent bloodmeal solution + .05 per cent K_2HPO_4 was employed in test-tubes, the cultures being inoculated with cysts from an old bloodmeal culture originally made from soil. After heating, the tubes received an inoculation of protozoa-free bloodmeal culture and were incubated at 30° C. Table 10 gives the results.

Table 10.

Temperature to which heated (° C)	A.	B.
60°	+	+
62°	+	—
64°	+	+
66°	+	—
68°	—	—
70°	—	+
72°	—	—
74°	—	—

From the results of this and the previous experiments one may safely conclude that a temperature of 72° will destroy the ciliates which develop on bloodmeal solution. Although the agreement between the various sets of results is not very exact, it should be noted that a difference of about 4° is of no consequence as the results obtained depend very largely on the rate of heating. In fact differences in the rate of heating can quite readily account for a difference of 4 degrees.

c) Amoebae. The results obtained in the first experiments with the amoebae were the most irregular and unsatisfactory of all. As examples some of the best are given in Table 11:

Table 11.

Temperature to which heated ° C	Soil extract + .05 % K_2HPO_4 in flasks, incubated 3 days with B. mycoides, inoculated with soil Incubation period 55 days		.5 % Bloodmeal (unfiltered) + .05 % K_2HPO_4 in flasks incubated 3 days with B. mycoides, inoculated with soil Incubation period 60 days		Giltay solution in test tubes incubated 3 days with B. mycoides, inoculated with soil Incubation period 45 days	
	A.	B.	A.	B.	A.	B.
60°	—	—	—	+	+	+
62°	+	—	+	+	+	+
64°	+	—	—	—	—	—
66°	—	—	—	+	—	—
68°	—	+	—	+	—	—
70°	—	—	—	—	—	—
72°	—	—			—	—

Although the first two series are very irregular they agree in that 68° is the highest temperature the amoebae have been able to resist. The third series gives a much lower result but as in the case of the flagellates it may be assumed here that the compactness of the soil in the test tubes has retarded cooling and therefore increased the effectiveness of the heat. As was the case with the flagellates 62° in series III is probably equivalent to about 68° in series I and II.

The remaining experiments which have been carried out with the amoebae are concerned with a pure culture of a form very common in bloodmeal and Omelianski's cellulose solutions (Table 12).

Table 12.

Temperature to which heated ° C	I. .5 % Bloodmeal (filtered) + .05 % K_2HPO_4 in test tubes, inoculated with amoeba cysts, heated, inoculated with protozoa-free culture from original cyst culture Incubation period 30 days		II. 1 % Bloodmeal (filtered) + K_2HPO_4 in test tubes, inoculated with amoeba cysts, heated, inoculated with protozoa-free culture from original cyst culture Incubation period 25 days	
	A.	B.	A.	B.
60°	+	+	+	+
62°	+	+	+	+
64°	+	+	+	+
66°	+	+	+	+
68°	+	+	+	—
70°	+	—	+	+
72°	—	—	—	—
74°	—	—	—	—

The results obtained in this instance are most satisfactory and show the death point of the amoebae to be 72°. Here too it is to be noted that the development from the heated cysts was very rapid, practically the whole of the protozoa, still alive, having excysted within about 3 days.

2. Effect of Heat upon Active Forms.

In this section of the work the first difficulty encountered was that of obtaining cultures quite free from cysts. One could never be quite sure that, on making a sub-culture on to fresh medium, the whole of the protozoa would at once excyst. It was therefore thought advisable to abandon long periods of incubation and to deal only with cultures containing sufficiently large numbers of protozoa to allow of satisfactory microscopic examination. The method of procedure was either to divide a culture showing large numbers of active forms into small portions and employ these for the experiments or to make a number of sub-cultures and allow them to excyst and multiply till a sufficient number of organisms for microscopic examination was present. In all cases the cultures used were examined immediately before heating and only those employed which showed a sufficiently numerous fauna. After heating they were allowed to settle for about ½ hour and again submitted to microscopic examination.

The experiments were divided into three groups: mixed cultures of flagellates, mixed cultures of ciliates and the amoeba pure culture used for the work on the effect of heat on the cysts. In the case of flagellates from bloodmeal solution the death point was found to be 44° C.: this was confirmed after 24 hours. A similar result was obtained with flagellates from Giltay solution. Active ciliates from bloodmeal solution were killed by a temperature of 54° C. The death point of the active amoebae in the pure culture above referred to was found to be 48° C.

3. Summary.

The results obtained in the experiments described in this section are summarised in Table 13.

Table 13.
Death point of active and encysted protozoa.

	Active forms	Cysts
Flagellates	44° C	70—72° C
Ciliates	54° C	72° C
Amoebae	48° C	72° C

In the case of the cysts the figures obtained are quite constant for the three forms of protozoa examined. The active forms however show marked differences in their power of resistance and it is note worthy that the latter appears to be roughly in proportion to the average size of the individuals.

The results show quite a marked difference between the powers of resistance to heat of the cysts and the active organisms — a difference at all events quite large enough to allow of the selection of an intermediate temperature which will kill all active forms but leave the cysts uninjured. In the fixing of this temperature, however, the retarding effect which heat has had upon excystation in these experiments must be kept in mind. It will, therefore, be advisable to take a temperature as little above the death point of the active ciliates as is absolutely necessary to ensure the killing of these organisms. Probably a temperature of 58—60° C would be suitable for this purpose.

It is interesting to compare these results with those obtained by Russell and Hutchinson[1]) in their experiments on the effect of various temperatures on the "limiting factor" in soil. It was found that a temperature of 55°—60° C was required to extinguish this injurious factor. This temperature is considerably lower than that required to destroy the cysts of protozoa as determined here. But it must be borne in mind that Russell and Hutchinson worked with soil and that the latter would cool much more slowly than liquid cultures. A temperature of 55°—60° C in soil would therefore be as effective as a much higher temperature (probably 65—70° C) in solutions.

With regard to the question of the effect of the protozoa-free culture no definite pronouncement can yet be made. Sometimes this method of treatment appeared to be beneficial: sometimes its effect seemed to be injurious. More work will require to be done on this subject before it can be either recommended or condemned.

---

[1]) Journ. of Agric. Sc. Vol. V. 2. p. 152.

Nachdruck verboten

The Bacteriology of the Hen's Egg, with special Reference to its Freedom from microbic Invasion.

[From the Storrs Agricultural Experiment Station, and from the Sheffield Laboratory of Bacteriology and Hygiene, Yale University.]

By **Leo F. Rettger.**

In the course of the extended investigation of bacillary white diarrhea of chicks which has been carried on at the Storrs Agricultural Experiment Station for the past three years bacteriological examinations have been made of more than ten thousand eggs. While the chief aim in view was the detection of Bacterium pullorum, the specific agent in the causation of the disease, a general bacteriological study was at no time neglected.

Most of the eggs came from the College and Station stock. Shipments were received, however, from numerous sources, and from different parts of the country. The Storrs eggs were collected from trap-nests. As a rule, only clean and apparently normal eggs were used in the tests, especially in the examinations of fresh eggs. Many of the eggs were fresh when examined, while others had been incubated, the incubation periods varying from one to three weeks.

In testing the yolks of fresh eggs the method used was that described and advocated in Station Bulletins 60 and 68, except at the beginning of the investigations and during the present year. The entire yolk was thoroughly mixed with 25 cubic centimeters of sterile bouillon in large test tubes especially designed for this purpose. After three to four days of incubation at 37° C. the tubes were kept for an additional period (24 to 48 hours) at ordinary room temperature. Direct transfers were then made to sloped agar by means of platinum loops.

Eggs which had been incubated at least one week were tested by the direct method. A small amount of the yolk was spread over the surface of tubed agar, and after being kept for one or two days at 37°, and for the same length of time at 20°, the tubes were examined for the characteristic growths of B. pullorum and for other organisms.

As it is impossible to remove the entire yolk from the shell without carrying some of the white with it, the indirect method does not discriminate absolutely between the white and the yolk. In order to obtain definite information regarding the white alone a large number of special tests were made during the past year. Five cubic centimeters of egg-white were removed with pipettes, and mixed with 100 cc. of bouillon in bottles. This was always done in duplicate, one bottle being kept at 20° and the other at 37, for four or five days. Fermentation tests were also made, for the detection of B. coli or closely-allied organisms.

It is practically impossible to detect the organism of bacillary white diarrhea in the yolks of fresh or unincubated eggs by merely transferring a loopful of yolk to sloped agar or agar plates. Even in eggs which have been kept at ordinary room temperature for two weeks the bacilli are so few, if present, as to almost certainly excape detection when sought for by the short or direct method. However, when eggs that are infected with B. pullorum are subjected constantly to a temperature of 36—37° for five or six days the bacilli become so numerous in the yolk that they may be found with ease, even in extremely small amounts of the yolk. Hence, it is desirable to use the entire yolk, or a large portion of it, in testing for the organism, or to examine eggs only which have been incubated for at least five or six days.

Bacterium pullorum may be recognized easily by its microscopic and cultural characters. Morphologically it closely resembles the members of the coli-typhi-dysenteriae group; also in its staining properties. Its growths on agar, however, are quite different, and resemble those of Streptococcus pyogenes. Agar colonies in plates and slant agar growths are so delicate as to escape detection easily by those who are not trained or accustomed to making examinations.

There appears to be little if any difference in the value of the two given methods of examining egg yolk for the presence of B. pullorum, namely the direct (for incubated eggs) and the indirect or enrichment method (for fresh eggs), in so far as the detection of the organism is concerned. The indirect method has the following disadvantage, however. It is impossible

Bacteriological Examinations of Eggs.

A. Fresh eggs. — Entire yolks.

Date Year and month	Number of eggs tested	Number giving positive results	Number containing B. pullorum	Per cent positive results, not including B. pullorum
1910				
July	104	56	23	31.7
August	107	24	1	21.5
September	115	13	0	11.3
Total:	326	93	24	21.2
1911				
February	36	4	1	8.3
March	181	13	3	5.5
April	321	27	10	5.3
May	621	98	67	5.0
June	237	34	19	6.3
July	152	25	3	14.6
August	290	48	8	13.8
September	56	11	2	16.0
Total:	1894	260	113	7.7
1912				
February	143	10	0	7.0
March	370	29	8	5.7
April	288	39	8	10.7
May	113	9	1	7.1
June	61	5	1	6.5
July	183	37	10	14.7
August	107	12	2	9.3
September	25	6	2	16.0
Total:	1290	147	32	8.9
Grand total for 3 years	3510	500	169	9.5

B. Artificially-Incubated Eggs. — Yolks (Direct method).

1. Incubated one week.

Date Year and month	Number of eggs tested	Number giving positive results (Total)	Number containing B. pullorum	Per cent positive, not including B. pullorum
1910				
June	38	4	4	0.0
August	221	10	5	2.2
September	209	8	0	3.8
Total:	468	22	9	2.8
1911				
February	8	1	0	12.5
April	39	5	2	7.7
June	14	6	6	0.0
July	175	7	3	2.3
August	35	0	0	0.0
Total:	271	19	11	2.9
1912				
March	268	7	0	2.6
April	50	1	0	2.0
May	204	2	0	1.0
July	135	6	0	4.4
August	144	1	0	0.7
October	206	10	2	3.9
Total:	1007	27	2	2.5
Grand total for 3 years	1746	68	20	2.75

2. Incubated two weeks.

Date Year and month	Number of eggs tested	Number giving positive results (Total)	Number containing B. pullorum	Per cent positive not including B. pullorum
1910				
June	175	10	3	4.0
1911				
February	17	1	1	0.0
May	89	4	3	1.1
June	510	17	11	1.2
Total:	616	22	15	1.1
1912				
January	44	1	1	2.3
February	416	3	0	0.7
March	228	2	0	0.9
April	405	7	5	0.5
June	144	7	3	2.8
July	99	1	0	1.0
August	40	3	1	5.0
Total:	1376	24	10	1.0
Total for 3 years	2166	56	28	1.3

to remove the entire yolks and to introduce them into tubes containing the bouillon without at least occasional contamination.

It is but natural to assume that what has been found to be true with reference to the organism of white diarrhea is true, at least to a large extent, with other bacteria which may be found in eggs. Therefore, the methods employed in the detection of B. pullorum in eggs should prove to be adequate in detecting other bacteria.

3. Incubated three weeks.

Date Year and month	Number of eggs tested	Number giving positive results (Total)	Number containing B. pullorum	Per cent positive, not including B.pullorum
1910				
June	120	16	12	3.3
July	334	41	17	7.2
August	136	10	6	3.0
September	66	5	0	7.6
Total:	656	72	35	5.6
1911				
February	35	0	0	0.0
April	125	1	0	0.8
May	52	3	3	0.0
June	369	46	42	1.1
July	225	28	12	7.1
Total:	806	78	57	2.6
1912				
March	111	6	1	4.5
April	316	8	2	1.9
August	53	12	11	2.0
September	42	3	2	2.4
Total:	522	29	16	2.5
Total for 3 years	1984	179	108	3.6

C. Examination of Whites of Fresh Eggs. (5 cc. quantities).

Date	Number of eggs tested	Number giving positive results (Total)	Number containing B. pullorum	Per cent positive
1912				
April	154	0	0	0.0
May	193	1	0	0.5
July	34	0	0	0.0
August	201	6	0	3.0
Total:	582	7	0	1.2

D. Fermentation Tests. — Whites of Fresh Eggs. (5 cc.)

Date	Number of eggs tested	Gas production in dextrose-broth
April and May	105	None

In the following tabulations of results the numbers of infections with B. pullorum have been deducted from the total (positive findings), in arriving at the positive results in per cent, since infection with B. pullorum is a direct indication of a pathological condition of the ovary, and the eggs which come from such ovaries can not be regarded as strictly normal. However, as eggs which contain the specific organism of white diarrhea are seldom found to harbor any other organism, they are included in the total numbers of eggs examined, as a matter of convenience in recording the results.

An analysis of the above tables will reveal facts which are of unusual interest. The small percentage of positive results for eggs which have been incubated from one to three weeks will undoubtedly cause much surprise in the minds of those wo are engaged in the production and marketing of eggs, and also scientists who have been particularly interested in this subject.

With the exception of the results obtained in 1910, the per cent of total infection of yolks of fresh eggs (Table A), excluding B. pullorum, as recorded here is quite low, when we consider that the whole yolks were used in making the tests. Furthermore, the chances of contamination with bacteria from the air, dust, egg-shells, etc., are very great, and some contamination from these sources will take place, even under the best practical conditions. That a large percent of the positive results is due to the invasion of extraneous bacteria in the bouillon tubes which receive the entire yolks can hardly be doubted. It has been easy to prove at different times that inefficiency or carelessness of the operator results in a corresponding increase in the number of positive tests.

In the summer of 1910 the examinations were made under most unfavorable conditions. Special precautions to exclude dust and draughts of air were neglected. The technique was quite faulty, due to inexperience of the person making the tests, and on account of the necessity of employing flasks the necks of which were too small to readily admit of the introduction of the entire yolks. In the two following years these handicaps were to a large extent overcome, as is shown by the low percentages of positive results in 1911 (7.7) and 1912 (8.9), as compared with 21.2 per cent for 1910.

In order to reduces all changes of contamination as much as possible, the following method of examining fresh eggs is being employed during the present year. Ten cubic centimeters of yolk are drawn with aseptic precaution into a long pipette and introduced into a bottle containing 100 cc. of bouillon. The rest of the procedure is the same as in the earlier method.

This method has the further advantage of excluding egg-white from the tests, and of furnishing definite information concerning the yolk itself, instead of the yolk plus the vitelline membrane. There is the disadvantage, of course, of not employing the entire yolk, as heretofore. The results of the tests are given in the following table.

E. Fresh Eggs, Yolks (10 cc.).

Date	Number of eggs tested	Number giving positive results	Number containing B. pullorum	Per cent positive results, not including B. pullorum
1913				
April	86	4	2	2.3
May	333	20	7	3.9
June	228	12	2	4.4
Total:	647	36	11	3.86

Even by this method much experience and skill of the operator is required in order to prevent foreign organisms from entering the dilution flasks and lessening the value of the results. It is highly probable that the above figures are much higher than they should be, owing to the presence of contaminating organisms. As compared, however, with table A the total percentage of general infection, excluding B. pullorum, is much less, namely 5.64 per cent. As the 10 cubic centimeters of yolk employed in this test constitute almost the entire yolk, the figures given in this table must be regarded as evidence of excessive contamination in the original tests in which the entire yolk is used in the manner described earlier. Even 3.9 per cent is, in all probability, considerably above the actual figures, could accidental invasion of bacteria in the tests be entirely prohibited.

Incubated Eggs.

The most surprising data which have been obtained throughout the investigation relate to eggs which were incubated for two weeks (Table B, 1). Only 13 eggs out of 1000 were found to harbor cultivable bacteria other than B. pullorum. It is difficult to offer a satisfactory explanation of the higher percentage of positive results which were obtained with eggs which were incubated for a period of only one week than with those which were subjected to the same temperature for two weeks. It is, of course, true that the first-test eggs are to a very large extent infertile; they also include some which, although they have been fertilized, have failed to undergo embryonic development.

While it is quite probable that some of the fertile eggs which failed to develop contained bacteria which prevented or arrested early development, the results recorded in the two tables (B, 1 and B, 2) indicate that fertilized eggs do not become more subject to bacterial invasion of the yolk than the infertile. In fact, they would appear, according to these data, less liable to bacterial invasion; which is contrary to general opinion.

That the relative number of eggs which harbor bacteria other than B. pullorum is greater for those which have been incubated three weeks than for the seven- and fourteen-day eggs is to be expected. The increase, however, over the first class is only 0.85 per cent; while as compared with the second class (two weeks) there is an increase of 2.3 per cent.

Egg-Whites. (Fresh Eggs).

During the past year the whites of 582 eggs were examined, by the method described in the first part of this paper. Of this number the whites of seven (or 1.2 per cent) were infested with bacteria, according to the results (Table C). All but one of these positive tests were made during the month of August, when 201 eggs were examined. B. pullorum was not found in the whites of any of the 582 eggs, although it was recovered from several of the yolks.

The percent of positive results obtained with the whites is undoubtedly higher than the actual facts warrant. In the month of August when 7 of the 8 positive results were obtained considerable difficulty was experienced in the sterilization of pipets. The gas pressure was insufficient to bring about complete sterilization unless the oven was heated for a very long time. It is probably safe to say that the whites of fresh, normal eggs are as a rule sterile, insofar, at least, as our present methods enable us to determine.

In the fermentation tests which were made to determine the presence in the whites of organisms of the B. coli type (Table D). 105 eggs were examined. The results were all negative.

It should be borne in mind that the results given in this paper were obtained in the examinations of eggs which were clean and free from defects in the shells, and which were gathered, as a rule, from trap-nests. The incubated eggs were incubated in standard artificial incubators.

Kinds of Microorganisms found in the Yolks of Fresh and of Incubated Eggs.

A thorough classification of the organisms was not attempted; but an effort was made at all times to relate them to their own particular groups or sub-groups. The following brief summary will be of some interest.

Fresh Eggs.

Organismus	Number of times found
Staphylococcus, usually aureus and albus	74
Subtilis group, usually ,B. mesentericus and B. ramosus	60
B. coli and closely related organisms	43
Proteus group	30
Streptococcus	14
Micrococcus (tetragenus, etc.)	9
Streptothrix	6
Diphtheroid bacillus	5
Putrefactive anaerobes	5
B. fluorescens	2
Mould	4
B. mucosus	3
Mixed	2
Total:	257

Incubated Eggs.

Organismus	Number of times found
Staphylococcus, usually aureus and albus	16
B. coli and closely related organisms	9
Subtilis group, usually B. mesentericus	8
Proteus group	5
B. pyocyaneus	5
Streptococcus	5
Streptothrix	3
Mould	2
B. fluorescens	2
Mixed	2
Diphtheroid	1
Mucosus type	1
Total:	59

The relatively large number of staphylococci met with in the tests, in both the fresh and the incubated eggs, is further evidence that there was considerable contamination, and especially since the Staphylococci were usually S. albus or aureus. The large number of cases in which members of the Subtilis group were recovered would suggest the same thing.

Organisms whose relationship to any particular groups were not determined are, of course, not included in the above lists. Furthermore, the figures apply to the investigations of the past two years only, as the data obtained in 1910 were incomplete.

The data which are presented in this paper are not in harmony with those of other investigators, particularly Artault[1]), Wiley[2]), Lamson[3]), Pennington[4]), Poppe[5]), Maurer[6]) and Stiles and Bates[7]).

Artault's results are briefly summarized as follows;

Micrococcus pyogenes aureus was found in 2 per cent of the fresh and 1—2 per cent of old eggs which were examined: B. prodigiosus in 4 per cent of dirty eggs; B. violaceum in 2 per cent of dirty; B. termo in 60 per cent of fresh and of spoiled eggs; B. amylobacter and Spirillum tenue in the same proportion; B. subtilis in 5 per cent of the fresh and in 1 per cent of spoiled, and B. pyocyaneus in 1 per cent of the spoiled eggs.

In Lamson's publication we are led to infer that in a large proportion of fresh eggs which were examined under his direction bacteria were found. Eggs laid in July, August and early September contained a greater number of bacteria than April, May and June eggs. According to him eggs may be infected by bacteria both in the oviduct, before laying, and through the pores and defects in the shell, after the egg is laid.

In the investigation reported by Miss Pennington only 7 out of 57 so-called fresh eggs were found to be sterile. In 18 of the experiments the yolk had the larger number of microorganisms, while in 11 instances the majority were in the white. In 21 the numbers for yolk and white were almost even. Thirty different species were isolated from 100 eggs.

Poppe found bacteria in 54 per cent of the eggs which were tested by him. Of these 60—70 per cent were Staphylococci; 14—20 per cent streptococci and bacilli. The bacilli were B. fluorescens non-liquefaciens, B. faecalis alcaligenes, B. proteus and B. mesentericus. The bacteria were found in both the whites and the yolks.

In the extensive investigation of Maurer 18.1 per cent of the total number of eggs that were tested yielded positive results when the culture tests were made at room temperature, while 8.3 per cent showed growth at blood temperature. Of the infected eggs 82 per cent were infected in the yolk, 25.9 per cent in the white, and 7.9 per cent in both white and yolk. These results more nealy approach those of my investigation than any others to which allusion has been made here. However, they are considerably in excess of the figures given in this paper. A large number of the eggs which were examined by Maurer were not laid in trap nests; there was enough evidence to infer that the infected eggs were not uniformly distributed over the whole number of eggs examined, but that they occurred in small groups.

---

[1]) Artault, Thése Paris. Abstract. in Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 16. 1894. p. 461.

[2]) Wiley, Bull. U. S. Dept. of Agricult. Bur. of Chem. No. 115.

[3]) Lamson, Bull. Storrs Agricult. Exp. Stat. 1909. No. 55.

[4]) Pennington, Journ. of Biol. Chem. Vol. 7. 1910. p. 109.

[5]) Poppe, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Bd. 34. 1910. p. 186; Abstr. in Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 49. 1911. p. 145.

[6]) Maurer, Bull. Kansas State Agric. College Exp. Stat. 1911. p. 180.

[7]) Stiles and Bates, Bull. U. S. Dept. of Agric. Bur. of Chem. No. 158.

Stiles and Bates made no serious effort to prevent all accidental contamination, so that for our purpose the results are not of much value. B. coli was not met with in 1 cc. quantities of 616 samples of whites examined between April and October, and in 613 yolks of the same eggs it was found but once. The largest number of sterile yolks was 39.78 per cent (April); in September the total number was 16.6 per cent, and in May 14.28 per cent. In April 62.36 per cent of the whites which were tested in 1cc. quantities were sterile; in May 45.71 per cent, and in June 30.12 per cent.

It is not within the province of this paper to criticize the results or the technique of other investigators. It is important, however, to emphasize the fact that the methods employed in the bacteriological investigation of eggs are often not beyond reproach. The employment of agar plates for the detection and enumeration of microorganisms may easily lead to serious error, especially if the plates are kept for some time before the final estimations are made. Whenever series of dilution plates are prepared it is often very difficult to correlate them. It would certainly be inadvisable to pick out the plates having the higher dilutions, or any individual plates which have but one or two, or even more, colonies, and base on them the final estimation. Contamination in the ordinary plate method is, as a rule, unavoidable.

Furthermore, when the entire yolk, or a large portion of it, is used for determining the presence of bacteria in eggs, as was done by Maurer and by myself in the examination of fresh eggs, the chances for contamination are not inconsiderable. In the present investigation every effort was made to reduce of the possibilities of infection with extraneous organisms to the minimum.

Bacteriological investigations have been made, from time to time, of old and of spoiled eggs, and usually with interesting results [Schrank[1]), Zörkendörfer[2]), Chrétien[3])]; but as the present investigation concerns itself with normal, fresh eggs and those which have been preserved or incubated under known, favorable conditions, a discussion of the bacteriology of the decomposed or spoiled egg hardly seems necessary.

It appears highly improbable that normal, fresh eggs should contain bacteria and moulds in such large proportions as has been indicated by various investigators. Of 3510 so-called "fresh eggs" examined in the present investigation by the old method only 331, or 9.5 per cent, contained bacteria in the yolk according to the tests. Of 647 yolks tested by the pipette method, only 25, or 3.86 per cent were positive. Even these numbers are without doubt an exaggeration, as many of the positive results are unquestionably due to contamination. Of the whites of 582 fresh eggs only 7, or 1.2 per cent, showed the presence of bacteria.

Out of 1746 eggs which had been incubated from 7 to 10 days 48, or 2.75 per cent, yielded positive culture tests; of 2166 that were incubated 2 weeks 28, or 1.3 per cent were positive; and of 1984 which had been in the incubator full three weeks but 71, or 3.6 per cent, were infected with bacteria other than B. pullorum.

That the tests were sufficiently far-reaching can hardly be questioned. Since the same technique was employed as for B. pullorum, the strikingly successful and corroborative results which have been obtained with that organism serve as valuable checks or controls throughout the investigation. Bacterium pullorum is a peculiarly delicate organism, in so far as its growt characteristics on the different media are concerned; hence methods which serve to bring this organism to view, when present in eggs, should also enable us to detect the ordinary bacteria which may be present.

---

[1]) Schrank, Wien. med. Jahrb. 1888. p. 320.

[2]) Zörkendörfer, Arch. f. Hyg. Bd. 16. 1893. p. 369—401.

[3]) Chrétien, Hyg. de la viande et du lait. Bd. 5. 1911. p. 517—528.

It is a matter of much surprise that eggs which have been incubated even as long as three weeks should be free from bacteria in such a large proportion as stated. These results are in keeping, however, with the experiences of several prominent poultrymen whom I have consulted. One of them informed me in all earnestness that he had frequently examined infertile eggs after they had been in the incubator three weeks, and had found them, as entire lots, to have the appearance of normal, fresh eggs, except that the white was usually thinner. Nor did they differ even as to odor and taste. Whether fertile or infertile, very few artificially incubated eggs which have been examined in the present investigation have been found to contain bacteria.

The developing ova in the ovary of a laying hen are, as a rule, sterile, unless the ovary is infected with the organism of bacillary white diarrhea. In the two hundred or more apparently normal ovaries which I have examined bacteriologically I have at no time been able to detect bacteria, moulds or any other microorganisms. Even in ova which were of abnormal appearance bacteria were at all times absent, except when there was invasion by the organism of white diarrhea, B. pullorum. In this event the bacillus in question was detected without difficulty; and furthermore, it was not accompanied by any other bacterium.

This does not exclude the possibility of microorganisms gaining an entrance from the blood into the yolk while the latter is being formed in the ovary; but in all probability infection in this manner does not often happen, except with B. pullorum.

Furthermore, it is quite unlikely that any appreciable amount of bacterial invasion into the egg takes place in the oviduct while the white is being deposited around the yolk, and while the shell is being formed. I have made numerous bacteriological examinations of the entire oviducts of laying hens, and with but very few exceptions have found them to be apparently sterile, except at and near the cloaca. The few moulds which were obtained in the tests were there, in all probability, as the result of outside contamination.

My observations are strongly supported by those of Horowitz[1]). This investigator claims that the oviduct of the hen is always sterile. After the experimental introduction of bacteria into the oviduct they were killed in the course of 48—72 hours. Horowitz believes the autosterilization of the oviduct to be due to the following; 1. Phagocytosis, which is favored by the lymphoid structure of the mucous lining. 2. Mechanical action of the walls of the oviduct, by which the contents are made to flow to the cloaca, and 3. The bactericidal action of the secretions (the albumin-producing agent of the oviduct, and the egg-white).

That egg-white has strong antiseptic qualities, and in many cases a marked disinfectant action on bacteria was demonstrated by Lasch-

---

[1]) Horowitz, Thése. Paris 1902. Abstr. in Baumgarten's Jahresber. Bd. 19. 1913. p. 984.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

tschenko[1]) and others, and fully corroborated by Sperry and myself[2]). It is quite probable that the secretions from the mucous layer of the oviduct exert a very important influence for the preservation of the egg against bacterial invasion and decomposition, in the egg's passage down the oviduct.

It is extremely difficult to find an explanation of the unqualified success which is attained with some of the strongly advocated processes for preserving or pickling eggs, unless it is assumed that sound, fresh eggs are, as a rule, sterile. Waterglass is being used extensively for preserving. It has been most successfully tested by various investigators, and adopted in many households. According to Lamson[3]), Morse[4]), Vanderleck[5]) and others, eggs, when preserved while in good, fresh condition, may be kept in water glass for many months without showing the least sign of decomposition. They retain the normal egg odor, are palatable, and may be prepared for the table in any manner, as boiled, scrambled or poached eggs, for example.

Water glass, or sodium silicate, has pronounced antiseptic properties. Furthermore, it seals the pores of the shells very quickly, and in this way also serves to keep out microorganisms. It does not sterilize the contents of the egg, nor does it act even as an antiseptic within the shell, which it does not penetrate, at least to any appreciable extent. Very low temperature is not necessary, apparently, in this method. Hence, the only safeguard of the contents of the eggs against bacterial decomposition from within is a state of absolute asepsis or sterility at the outset. This conception is in harmony with the results of my investigations on the bacteriology of fresh eggs, and with the statements of Zörkendörfer[6]) and of Morse[2]).

Zörkendörfer asserts that one fifth of the eggs which are marketed are decomposed and unfit for consumption. The loss sustained in our own country from "spoiled" eggs is even greater. It is safe to say that it amounts to many millions of dollars annually. What are the chief causes which operate in bringing about this enormous waste of one of the most valuable foods which man consumes? This problem is difficult of solution, but certain suggestions are not out of place here.

Even if it is admitted that bacteria and moulds are unable to penetrate the normal shell of an egg under what may be termed normal conditions, bacterial invasion may, and undoubtedly does, take place under conditions which are not conducive to the preservation of any ordinary food product, as for example filth, moisture, increased temperature, etc. The shell of a fresh egg is coated with a thin layer of gelatinous substance which under normal conditions protects the egg from bacterial invasion. It is a well-known fact that buyers and shippers of eggs give instructions to those from whom they purchase that the eggs must not be washed. Dirty and washed eggs are usually rejected.

Zörkendörfer[7]) claims to have shown that bacteria can and do penetrate the shell. In his experiments the shells were washed thoroughly with soap and water, and disinfected with corrosive sublimate and with alcohol.

---

[1]) Laschtschenko, Ztschr. f. Hyg. Bd. 64. 1909. p. 419—426.
[2]) Rettger and Sperry, Journ. Med. Res. Vol. 26. p. 55—64.
[3]) Lamson, Bull. Storrs Agric. Exp. Stat. No. 55. 1909.
[4]) Morse, Reliable Poultry Journ. Vol. 19. 1912. p. 656.
[5]) Cited by Morse.
[6]) Zörkendörfer, Arch. f. Hyg. Bd. 16. 1893. p. 369—401.
[7]) Loc. cit.

Piorkowski[1]) placed eggs in a dish and partly covered them with a peptone medium which had been inoculated on the preceding day with Bacillus typhosus. The typhoid bacillus was recovered from the egg contents in the course of 24—48 hours. There was better penetration at 28° und 37° C. than at 21°. Wilm[2]) had by essentially the same method demonstrated that the vibrio of Asiatic cholera can pass through the unbroken shell in 15—16 hours. The colon bacillus and certain common water bacteria were able to do the same thing. According to Wilm, the ability of bacteria to enter the egg through the shell depends on their motility and size.

Lange[3]) placed eggs, after sterilization with corrosive sublimate and ether, in bouillon cultures of B. coli, B. typhosus, B. paratyphosus, B. enteritidis of Gaertner, and B. botulinus. B. typhosus required two days to enter the white, and three days to penetrate into the yolk (37° C.). B. coli may reach the white in one, and the yolk in five days. Tests made in a similar manner by Sachs-Müke[4]) with dysentery bacilli and moulds (Mucor corymbifer, Aspergillus niger, Penicillium glaucum and P. brevicaule) gave negative results. Too much emphasis should, however, not be put on these results, as all of the organisms which were used in the tests were nonmotile, or at most but feebly motile (B. dysenteriae).

Kossowicz[5]) holds that normal shells are not penetrated by bacteria; that before the microorganisms can make an entrance the shell must have undergone some change, as by age. He did not subject the shells to preliminary treatment, by which the normal character of the shell may be changed. Kossowicz found that it takes eight weeks for Cladosporium herbarum to enter the interior of eggs, and twelve weeks for Phytophthora infestans to make its entry. These results are not surprising when we consider that the coating on the shell was not disturbed, and note the size and the nature of the organisms employed.

As long as the shells of eggs are kept clean and dry there is little danger from bacterial invasion. The soiling of shells, especially with fecal matter, lowers the chances of preservation of the contents. Eggs which are soiled are no longer germ-proof. Furthermore, eggs which are kept in damp places are apt to spoil, as the moisture that collects on them destroys or weakens the protective coating, and enables bacteria to work their way into the interior. When eggs are soiled and when the shells are in a moist condition, increased temperature facilitates decomposition. For clean, dry eggs warmth or elevated temperature does not to any appreciable extent hasten bacterial decay. These conclusions are fully supported by the statements of other investigators.

As the result of his thorough study of the decomposition of eggs Schrank[6]) held the view that the bacteria which are present in spoiled eggs make their entrance through the shell. Under the influence of moisture the shell is deprived of its gelatinous covering, and bacteria can, as a result

---

[1]) Piorkowski, Arch. f. Hyg. Bd. 25.

[2]) Wilm, Acrh. f. Hyg. Bd. 23. 1895. p. 145—169.

[3]) Lange, Arch. f. Hyg. Bd. 62. 1907. p. 201—215.

[4]) Sachs-Müke, Arch. f. Hyg. Bd. 62. 1907. p. 228—238.

[5]) Kossowicz, Monatsh. f. Landw. Bd. 5. 1912. p. 43—49.

[6]) Cited by Zörkendörfer.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

easily pass through the porous parts of the shell. Zörkendörfer[1]) claims that neither the shell nor the membrane underneath can be regarded as impervious to microorganisms. He found that very few eggs showed signs of decay of a bacterial nature when kept in a dry atmosphere. Of those which were kept in a moist chamber all underwent offensive decomposition. Incubation of the eggs which were kept dry had but an inappreciable effect on the extent to which the eggs became decomposed. That the moisture had no determining influence on the action of bacteria which were in the egg was shown by experiments in which he inoculated the contents of fresh eggs with bacteria which are associated with the putrefaction of eggs. The inoculated eggs which were kept in dry air decayed rapidly.

We have frequently had occasion to observe the detrimental influence of dirt and moisture on the keeping qualities of eggs. Of a large number of eggs which were stored in an ordinary refrigerator all were found, after three or four weeks, to be permeated with moulds. In other instances we have found bacteria, under similar conditions. In a crate filled with eggs which had been placed in a damp dark basement, and which had remained there for several weeks, all of the eggs were in an advanced state of rotting, when brought to light and examined. These eggs had come from the same hens the eggs of which had been tested constantly and found as a rule to be free from bacteria.

It is a well-known fact that eggs which have been incubated under hens, and which fail to hatch, are usually foul. We have observed this again and again, especially during the warm summer months. It is quite probable that the hen which is incubating the eggs is responsible for the rotting, in that the eggs become more or less soiled by her; and furthermore, the hen imparts a certain amount of moisture to the eggs, especially during warm weather, which aids the bacteria which are on the soiled shell to gain an entrance into the egg. On the other hand, eggs which are incubated artificially remain undecomposed, with very few exceptions, for at least two or three weeks, and undoubtedly much longer, providing they are clean, fresh eggs when they are put into the incubator.

It is of the greatest importance that a general campaign be waged to secure eggs for consumption, and especially when they are to be preserved in cold storage, which are clean and perfectly fresh. The solution of this problem rests with both the producer and the buyer. In the first place, the gathering of eggs from the nests soon after they are laid can not be urged too strongly. They should be collected at least once a day, and whenever possible two or three times. This is usually done on large plants where trap nests are used; but on the smaller plants, and especially on farms where poultry raising is but one of many pursuits in the making of a livelihood there is often no system in the poultry management. Eggs are frequently left in the nests two or three days, and under broody hens. Furthermore, many eggs enter the market which have been under sitting hens for many days in so-called "stolen nests".

The movement which is on foot in parts of this country to purchase and pay for eggs according to their quality or soundness, rather than by mere weight or numbers, should meet with hearty support. In many instances this has been done but the practice should become general. Producers would then be brought face to face with the necessity of keeping nests in sanitary conditions, and of gathering eggs soon after they are laid.

---

[1]) Loc. cit.

The handling and keeping of eggs should also receive much consideration. It is necessary that the eggs be kept clean, dry and reasonably cool. They should be transported in clean receptacles. When placed in cold storage the rooms in which they are kept must be dry.

Summary and Conclusions.

The contents of normal fresh eggs are, as a rule, sterile. It is quite probable that an egg yolk may become invaded before it is expelled from the ovary; but this apparently is an uncommon occurrence except when the ovary is infected with the organism of bacillary white diarrhea.

Little, if any, infection takes place in the oviduct while the white and the shell are being deposited, on account of the protective action of the mucous lining and its secretions, and also the antiseptic, and in many cases, bactericidal action of the egg-white itself.

Even eggs that have been incubated artificially for three weeks remain relatively free from bacterial decomposition, providing they were fresh and clean when placed in the incubator.

Under normal conditions the shell is bacterium-proof. Moisture lessens its impervious character, however, and when combined with dirt or filth, makes it possible for microorganisms to enter and bring about decomposition. Increased temperature then hastens the decomposition.

Eggs should be gathered from the nests soon after they are laid; the nests must be kept in a sanitary condition, to prevent soiling of the eggs.

When they are to be preserved for any length of time only clean, eggs should be selected; unless they are placed in preserving fluids, eggs must be kept dry.

In the present investigation there has been no evidence to indicate that fertilized eggs "spoil" or undergo bacterial decomposition more readily than the unfertilized. No reference is here made to physiological changes which take place independently of bacterial action, as during ordinary incubation or continued storage.

Note: Since the above paper event into print a recent publication by Kossowicz („Die Zersetzung und Haltbarmachung der Eier". Wiesbaden 1913, Verlag von J. F. Bergmann) came to the writers notice. The results and conclusions of Kossowicz are in perfect accord with those of the present investigation.

Nachdruck verboten.

Trichopeltaceae n. fam. Hemisphaerialium.

Von **F. Theißen**, Innsbruck.

Mit 7 Textfiguren und 1 Tafel.

Im Jahre 1840 veröffentlichte Montagne in den Annal. scienc. nat. Ser. II. T. 14. p. 328 sein Asteroma Labecula aus Cayenne. welches die Grundlage der neuen Familie der Trichopeltazeen bildet. Die Art wurde 1856 von Montagne in der Syll. crypt. p. 255 zu Asterina gezogen, wurde von ihm selbst noch einmal aus Chile konstatiert (Fl. Chil. VII. p. 475), blieb aber dann verschollen und unbeachtet bis in die letzten Jahre. Aber nicht sie, sondern die 1868 gegründete Asterina reptans B. et C. wurde der Anstoß neuer Erkenntnisse. Ein glücklicher Fund Puiggaris lenkte Spegazzinis Aufmerksamkeit auf letztere Art, die er in einem Exemplare der Fungi Cubenses Wrightiani 734 in seinem Herbar besaß. Er erkannte die weitragende Verschiedenheit zwischen ihr und Asterina und stellte für sie die neue Gattung Trichopeltis auf (Fungi Puiggariani no. 364), der er als zweite Art den Puiggarischen Fund als Trichopeltis pulchella zugesellte. (Daß Spegazzini Berkeleys Asterina reptans in Brasilien wiedergefunden habe, wie v. Höhnel in Fragm. z. Myk. no. 325 meint, ist unzutreffend; die Aufstellung der Gattung erfolgte lediglich auf Grund des in seinem Besitze befindlichen F. Cub. Wright. 734.)

Spegazzini war überzeugt — auf Grund der Übereinstimmung im vegetativen Aufbau — in reptans und pulchella zwei generisch gleiche Pilze vor sich zu haben, obschon sich erstere als unreif erwies. Jetzt, wo wir mehr Formen kennen und bei vegetativ sehr ähnlichen Pilzen phaeodidyme (Trichopeltella), hyalodidyme (Brefeldiella) und dreizellige (Trichopeltis pulchella) Sporen finden, erscheint uns eine solche Annahme verfrüht. Doch ist es möglich, daß beide Arten sogar spezifisch identisch sind, zumal der Thallus ganz gleich gebaut ist.

Die Gattung Trichopeltis blieb bisher ebenso wie Brefeldiella und selbst Trichothyrium bei den Mikrothyriazeen, da ihre Gehäuse einfachhin als „dimidiato-scutata“ galten. Die erste Anregung, die bisher bekannten Formen Trichopeltis, Trichopeltella und Brefeldiella in einer Trichopelteen-Gruppe enger zusammenzufassen, ging von v. Höhnel aus (Fragm. X. 1910. no. 521), doch ohne daß diese mehr inzidente Bemerkung systematisch fixiert und verwertet wurde; auch dachte man noch nicht an eine Abtrennung der genannten Formen von den Mikrothyriazeen.

Es ist jedoch längst eine dringende Notwendigkeit geworden, die Trichopelteen als eigene Familie zu konstituieren und von den Mikrothyriazeen abzulösen.

Bei den Mikrothyriazeen entsteht aus der keimenden Spore ein fädiges Mycel von verzweigten, aber einfachen (d. h. aus einer einzigen Zellreihe bestehenden) Hyphen, welches entweder persistiert (Asterina, Calothyrium, Asterinella, Clypeolella) oder nach Anlegung der Thyriothezien rasch verschwindet (Microthyrium, Seynesia). An den Hyphen entstehen — als selbständige Gebilde eigener Art und Konstruktion — die Gehäuse (Thyriothezien). Entstehungsweise, Wachstum und morphologische Struktur charakterisieren das Thyriothezium als etwas vom Mycel total verschiedenes. — Man vergegenwärtige sich die Anlage der Gehäuse z. B. bei Asterina Veronicae (cfr. Theißen, Die Gattung Asterina, T. IV. f. 6): Der longitudinal wachsende Mycelfaden bildet terminal oder ventral einen Knoten von wenigen, kurz gedrängten Zellen, der — entgegen der Wachstumstendenz der Mutterhyphe — zentrifugal radiär zur Scheibe auswächst und sich früher oder später durch Sprengung des erzeugenden Mycelfadens vom Mycel unabhängig macht.

Nicht nur abweichend, sondern grundverschieden sind die Verhältnisse bei den Trichopelteen. Die Fig. 1—4 mögen dazu dienen, die Eigenart des vegetativen Thallus der Trichopelteen zu veranschaulichen. Aus der Keimhyphe entsteht durch wiederholte Gabelung ein rundliches, aus kurzem Parenchym in gestrecktes radiäres Prosenchym übergehendes einschichtiges Häutchen. Dieses wächst nun entweder direkt bandförmig in einer einzigen Richtung aus oder vergrößert sich nach mehreren Richtungen zugleich, die Bandform nach mehreren Seiten potentiell ausbildend. In letzterem Falle muß notwendig ein „Wirbel" entstehen (Fig. 1), d. h. ein Knotenpunkt von Zentren verschiedener radiärer Membranen (wie auch im ersten Falle, sobald einfache oder mehrfache Gabelung des Thallusbandes eintreten soll). Die Zellreihen der immer einschichtig bleibenden Membran schließen lückenlos aneinander und bestehen aus rechteckigen, schmalen Zellen von ziemlich konstanter Form und Größe. In letzterer Hinsicht besteht nur ein Unterschied zwischen zentralem und peripherischem Zellengewebe. Das zentrale, dessen Zellen beträchtlich breiter und variabler sind als die des peripherischen, liegt im Mittelpunkt der „Wirbel" oder — bei den linearen Bändern — als axillärer Strang in der Mitte des Bandes; man möchte es das „Kambium" der Thallusmembranen nennen. Das peripherische Gewebe bildet die antiklinen Flanken der linearen Bänder (Fig. 2 b) oder auch die Randpartien der rundlichen Häutchen (Fig. 3). Entwicklung

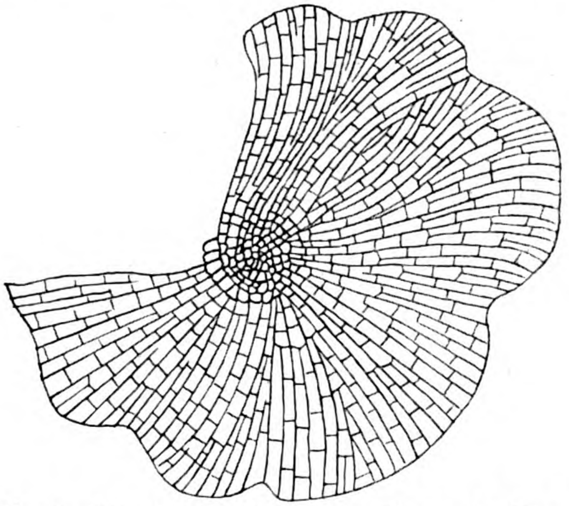


Fig. 1. Brefeldiella brasiliensis Speg. Ein Knotenpunkt (Wirbel) im radiären Gewebe. Vergr. ca. 500.

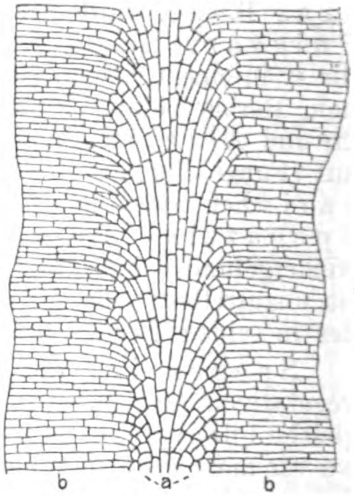


Fig. 2. Trichopeltis pulchella Sp. Stück eines Thallus-Fadens; a Zentralstrang, b Antiklinen. Vergr. ca. 500.

und Struktur dieser radiär-bogigen Randlappen ist unmittelbar klar. Besonders eigenartig erscheint das peripherische Gewebe in den linearen Bändern. Hier liegen die schmalen gestreckten Hyphen fast genau parallel nebeneinander, senkrecht zum freien Rand und zum Zentralstrang; sie entstehen aus letzterem, indem die derberen Hyphen desselben sich gabeln, einen der beiden Zweige weiter nach oben senden, den anderen in kurzem, scharfem Bogen seitwärts legen, wo er — häufig unter mehrfacher kurzer Querteilung — in die schmale Flankenhyphe übergeht; der ungebogen nach oben entsandte Zweig der Stammhyphe gabelt sich bald wiederum, worauf derselbe Vorgang sich wiederholt. Bei den Randpartien der mehr rundlichen Thalluslappen findet sich häufig eine schöne, konzentrisch zum freien Rand verlaufende, wellenförmige Furchung, indem die letzten Querwände der Hyphenreihen sämtlich in nahezu gleichen Abständen vom Rande eingelegt werden (Fig. 3).

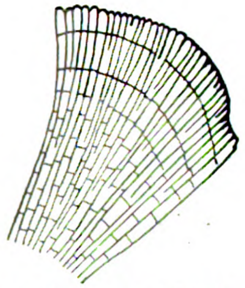


Fig. 3. Brefeldiella brasiliensis Speg. Peripherischer Sektor der unverdichteten Membrane.

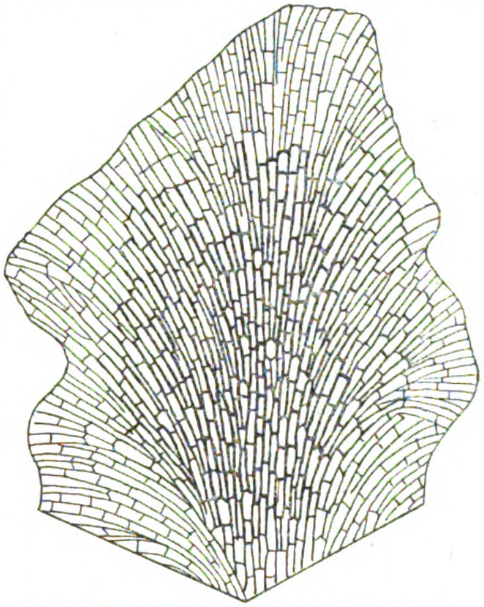


Fig. 4. Colenso 302 (Asterina reptans). Bildung des Pyknothezium (erstes Stadium der Verdichtung). Vergr. ca. 500.

In dem Thallus werden die Fruchthöhlungen — Pyknothezien nenne ich sie — dadurch gebildet, daß eine ungefähr kreisrunde oder auch etwas elliptische Gewebepartie anfängt, sich leicht emporzuwölben und die Zellwände zu verstärken, wobei ihre Farbe aus graugrün in dunkles Braun übergeht (Fig. 4). Verkürzung der Zellen durch Einlagerung neuer Querwände findet in diesem ersten Stadium nur in sehr beschränktem Maße statt. Diese fertile Zone liegt mit Vorliebe zwischen einem „Wirbel" und dem freien Thallusrande, öfters auch in einem linearen Band (und dann ohne Unterschied Zentralstrang und Flankenpalissaden umfassend), niemals aber in einem Wirbel selbst (das ist so, daß der Wirbelmittelpunkt zum Zentrum des Pyknotheziums würde). Im weiteren Verlaufe teilen sich nun die einzelnen Zellen — unter zunehmender Aufwölbung der Membran — nach oben und unten, am stärksten gegen den Mittelpunkt der entstehenden Fruchthöhle. So entsteht ein vielschichtiges, kompaktes, undurchsichtiges Gewölbe von kurzen, polygonalen, derbwandigen Zellen. Schläuchen und Sporen wird der Austritt dadurch ermöglicht, daß im Scheitelpunkt der Wölbung Zellgruppen reduziert werden, wodurch eine unregelmäßig rundliche oder länglich-spaltförmige Öffnung (kein typisches Ostiolum) entsteht.

Der Thallus bildet also die „Gehäuse“ nicht außerhalb sich selbst, weder terminal noch dorsal oder ventral, nicht als ein Gebilde anderer Konstruktion, sondern in und durch sich selbst: der Thallus wird an bestimmten Stellen selbst zur Fruchthöhle, indem dort durch Verdickung der Zellwände, Einfügung neuer Querwände und Zellteilung nach mehreren Seiten das Gewebe verdichtet wird; die Gehäuse sind mit anderen Worten nur verdichteter Thallus (daher „Pyknothezien“).

Zwischen der Anlage der Trichopelteen- und Mikrothyriazeengehäuse waltet also ein ähnlicher Unterschied ob, wie etwa zwischen endogener und exogener Entstehungsweise.

Man könnte ja auch versucht sein, die radiären Bänder des Tallus als „verlängerte Gehäusemembran“ aufzufassen: bei dieser Auffassung, die durch obige Darlegung schon widerlegt zu sein scheint, wäre Trichopeltis nichts anderes als ein Microthyrium mit vegetativem Ausschlag, Trichopeltella eine vegetativ üppige Seynesia. Abgesehen davon, daß bei dieser Annahme die neuen Gattungen sehr schwach begründet wären, führt sie uns zu Inkonvenienzen, die eine solche Auffassung unannehmbar erscheinen lassen.

Zunächst stände die Ausdrucksweise, „verlängerte Gehäusemembran“, im Widerspruch mit der Genese der in Frage stehenden Teile, insofern die Thallusbänder vor den Gehäusen existieren, während sie doch als Verlängerung erst nach derjenigen Membran entstehen dürfte, deren Verlängerung sie bildet. Sodann müßten in dieser Auffassung Gehäusemittelpunkt und Wirbelzentrum (vergl. oben) zusammenfallen, was gerade im Gegenteil nie eintritt. Schwer verständlich ist es auch, daß eine Gehäusemembran — ein Gebilde mit lokal begrenzter Funktion — endlos weiter wachsen soll bis zum Hundertfachen ihrer Ausdehnung. Bei der Mycelhyphe nimmt uns ein solches Wachstum nicht wunder: ihre Aufgabe ist es ja, den Pilz in generationsfähigen „Filialen“ weithin über das Blatt zu verbreiten. Die Gehäusemembran soll die Fruchtschicht decken; übernimmt sie es aber, weiter zu wandern und Kolonien zu gründen, so hört sie eben auf, Gehäusemembran zu sein und muß Thallus, vegetativer Zwischenträger oder Subikulum genannt werden (letzterer Ausdruck wäre jedoch ungenau, da die Gehäuse nicht auf ihm entstehen). Schließlich, wenn die „verlängerte Gehäusemembran“ wieder ein Gehäuse bildet, kämen wir zu der Schlußfolgerung, daß ein Gehäuse ein anderes erzeugt; wir sind jedoch gewohnt, Fruchtträger aus vegetativen Teilen entstehen zu sehen und es als teratologische Ausnahme zu betrachten, wenn ein Fruchtkörper einen anderen hervorbringt.

Nach dem Gesagten wird es hinreichend begründet erscheinen, die Trichopelteen zu einer eigenen Familie der Trichopeltaceae zusammenzufassen.

Der tiefgreifende Unterschied zwischen Arten mit ganz ausgebildeten Gehäusen und halbiert schildförmigen ist bisher in unseren systematischen Anschauungen nicht recht zum Durchbruch gekommen. Heute, wo wir bereits eine ziemliche Übersicht über die einschlägigen Formen gewonnen haben, die allerdings noch weit von einer einigermaßen befriedigenden Vollständigkeit entfernt ist, wäre es angebracht, so grundverschiedene Pflanzen scharf zu trennen und als Hemisphaeriales (oder, wenn man will, Mikrothyriales) alle schildförmigen Typen zu vereinigen und den Sphaeriales mit ganzen Gehäusen koordiniert entgegen zu stellen.

In der Ordnung der Hemisphaeriales kann man dann füglich unterscheiden:

1. Familie Microthyriaceae: Gehäuse (Thyriothezien) radiär, invers; Thallus fädig, bleibend oder vergänglich.

2. Familie Trichopeltaceae: Thallus membranös-radiär; Gehäuse pyknotisch im Thallus gebildet (Pyknothezien).

Zwanglos ließen dann wohl auch je nach Bedarf noch andere Familien sich einfügen für diejenigen Typen, die man in letzter Zeit als „schildförmige Sphaeriazeen“ (Hemisphaeriaceae) bezeichnet hat oder sonst bei den Mikrothyriazeen nicht unterzubringen wußte. Ob die Ordnung der Hemisphaeriales nur Arten mit oberflächlichen Gehäusen aufzunehmen habe oder auch eingewachsene umfassen solle, wäre eine Frage von sekundärer Bedeutung.

Trichopeltaceae n. Fam. **Hemisphaerialium.**

Thallus vegetativus superficialis, membranosus, radiato-prosenchymaticus. Loculi ascigeri in ipso thallo pycnotice transformato evolvuntur, peltati, ostiolo demum irregulari aperti.

Synopsis:

Da die Bildung der Pyknothezien im wesentlichen bei allen Arten dieselbe ist, muß für eine vorläufige Übersicht in erster Linie die Eigenart des ganzen Thallus als unterscheidendes Merkmal herangezogen werden. Unter diesem Gesichtspunkt bilden Brefeldiella und Pycnocarpon einen scharfen Gegensatz zu den übrigen Gattungen, indem ihr Thallus nicht die charakteristische, verzweigte Bandform aufweist wie reptans, sondern in rundliche Scheiben auswächst, die, vielfach ineinander wachsend, unregelmäßig begrenzte Häutchen bilden (dabei können auch streckenweise, aber mehr zufällig, Pseudobänder entstehen, wenn mehrere Scheiben in einer Richtung zusammenwachsen; dieselben unterscheiden sich aber mikroskopisch durchaus von den echten Bändern.

Diese beiden Grundtypen werden dann weiter nach Sporenteilung und Sporenfarbe untergeteilt. Als Typus der Gattung Trichopeltis Speg. ist die erste gut bekannte Art, Trichopeltis pulchella, zu nehmen. Würde man, wie Spegazzini es getan, reptans als Typus beibehalten, deren Fruchtschicht ganz unbekannt ist und die nicht einmal als Leptothyrium genügend beschrieben werden kann, so wäre eine sichere Benennung von pulchella unmöglich, da deren generische Übereinstimmung mit reptans sehr fraglich ist; oder man müßte dann auf gut Glück für pulchella eine eigene Gattung aufstellen, es der Zukunft überlassend, ob sich diese neue Gattung mit Trichopeltis als synonym herausstellen wird oder nicht. Die generische Gleichheit beider Pilze einfach voraussetzen, wäre unwissenschaftlich; man liefe dabei auch Gefahr, daß alle späteren Arten mit dreizelligen Sporen unbenannt bleiben müßten, wenn sich die Sporen der reptans etwa als zweizellig herausstellen würden, ebenso wie dann auch jene mit dreizelligen Sporen samt pulchella einen neuen Gattungsnamen erhalten müßten; derartige Operationen sollten aber, glaube ich, tunlichst vermieden werden, da sie ohnehin in beängstigender Weise unsere Nomenklatur erschweren. Da die Erhebung einer unreifen Art zum Typus einer neuen Gattung in sich schon verfehlt war, halte ich es für geboten, **pulchella** als Typus der Gattung **Trichopeltis** zu betrachten, und die zweifelhafte **reptans** als fragliche zweite Art anzuschließen.

Die Trennung der Gattungen nach Form und Farbe der Sporen ist immerhin noch etwas problematisch. Ob die Sporen der **Asterina Labecula** auch in ausgereiftem Zustande zweizellig sind, hat schon v. **Höhnel** als fraglich hingestellt; ebenso sind die Sporen von **pulchella**, wie ich schon in den Fragm. brasil. no. 122 bemerkt habe, noch sehr jung; auch bei **Brefeldiella** hält **Spegazzini** es für möglich, daß die Sporen vierzellig und farbig werden. — **Gilletiella** Sacc. et Syd. (**Heterochlamys** Pat.) habe ich nicht gesehen, doch scheint dieselbe eher zu **Polystomella** zu gehören, als zu den Trichopeltazeen.

A. **Thallus linien-bandförmig, verzweigt: Trichopeltineae.**	
I. Sporen zweizellig.	
1. Sporen farblos.	1. **Trichopeltina** Theiss.
2. Sporen gefärbt.	2. **Trichopeltella** v. Höhn.
II. Sporen dreizellig, farblos.	3. **Trichopeltis** Speg.
III. Sporen vierzellig, farblos.	4. **Trichopeltula** Theiss.
B. **Thallus rundlich, zusammenfließend: Brefeldiineae.**	
I. Sporen zweizellig.	
1. Sporen farblos.	5. **Brefeldiella** Speg.
2. Sporen gefärbt.	6. **Pycnocarpon** Theiss.
[II. Sporen dreizellig, farblos.	7. **Gilletiella** S. et S.]

1. Trichopeltina Theiss. n. gen.

Thallus superficialis, vittaeformis, ramificatus, radiato-prosenchymaticus. Pycnothecia in thallo formata, peltata, centro demum irregulariter pertuso (ostiolo non typico). Asci aparaphysati. Sporae hyalodidymae.

1. **Trichopeltina Labecula** (Mont.) Th.

Syn.: **Asteroma Labecula** Mont., Ann. sc. nat. 1840, Ser. II. Bd. 14. p. 328.
Asterina Labecula Mont., Syll. pl. crypt. 1856. p. 255. — Sacc. Syll. F. I. p. 44.
Trichopeltis Labecula (Mont.), v. Höhn. Fragm. z. Myk. X. no. 521.

Auf lederigen Blättern, Cayenne (lg. Leprieur). Auf Blättern von **Azara serrata**, Süd-Chile, (lg. Gay). Auf Blättern von **Desfontainia** sp., Valdivia, Chile (Gay); cfr. Flora Chil. VII. p. 475.

Nach der Beschreibung v. **Höhnels** bildet der Pilz auf der Blattunterseite (bei **Azara** auf der Oberseite) „ausgebreitete, dünne, glatte, schwarze Überzüge, die in lineare, schmale, einige Millimeter lange Bänder übergehen, welche sich verschiedentlich kreuzen und die Blattepidermis überziehen. Mikroskopisch zeigt sich, daß freie Hyphen völlig fehlen. Der Pilz besteht aus einer einzellschichtigen Membran, welche aus parallelen, radiär oder in Antiklinalen verlaufenden Reihen von meist rechteckigen, braunen, 4—7 = 2—3 μ großen Zellen aufgebaut ist und am Rand in lineare, 100 bis 200 μ breite, ebenso gebaute Bänder, die so wie die Membran der Epidermis fest anliegen, übergeht. Hie und da sieht man nun auf der Membran radiär gebaute, 120—160 μ breite, runde, nicht scharf begrenzte, dunkler, fast opake Flecke, in deren Mitte sich je ein rundliches, 10—12 μ breites Ostiolum befindet. Unter diesen Flecken, welche die Perithecien sind, entstehen die Aci, die, da das Originalexemplar ganz unreif ist, nur unvollständig beobachtet werden konnte. Sie sind keulig, oben abgerundet und dickwandig, in der Mitte oft bauchig, unten spitzlich vorgezogen, 34—42 = 10—14 μ. Die Sporen liegen zweireihig, anscheinend zu acht im Ascus, sind (unreif) hyalin, länglich, quergeteilt, vielleicht vier- bis fünfzellig und etwa 25=5 μ groß.“

Die Thallusbänder sind linear, unbeständig die Richtung wechselnd, unregelmäßig verzweigt, auf älteren Blättern einen fast kontinuierlichen Überzug bildend. Die bei den meisten reptans-Kollektionen sich vorfindenden Torula-artigen, 10—13 μ dicken Hyphen fehlen auch hier nicht (vergl. bei reptans). Die Struktur der Membranen sowie die Entwicklung der Pyknothezien wurde bereits in der Einleitung besprochen; darin stimmen Labecula, montana, reptans, pulchella und chilensis derart überein, daß sie nach diesem Bestandteil auch spezifisch nicht unterschieden werden könnten. Die länglichen Zellen des peripherischen Gewebes messen etwa 8=3 μ, die des Zentralstranges 6—8 =4—5 μ; die Farbe ist durchgehends braun in Abstufungen. Die Pyknothezien treten fast ausschließlich in kreisrunder Form auf, bis 200 μ im Durchmesser; elliptische, ca. 250=130 μ große, sind ziemlich selten. Entwickelte Asken habe ich nicht gesehen; vorläufig jedoch müssen die Sporen als farblos-zweizellig gelten, solange nicht anders geartete Sporen an reiferem Material nachgewiesen werden.

Bei der chilenischen Azara-Kollektion sitzen die Membranen großenteils einem mäandrischen Gewebe von zarten, 2—2½ μ breiten, hellen Hyphen auf, welches jedoch einem sehr kleinen unreifen Calothyrium angehört, das sich ebenfalls auf den Blättern zerstreut vorfindet.

2. **Trichopeltina chilensis** (Speg.) Theiss.

Syn.: Trichothyrium chilense Speg. — Fungi Chilenses p. 106 (1910).

Auf Blättern einer Eugenia, Bahia de Corral, Chile; häufig.

Epiphyll. Bänder unregelmäßig verzweigt, nach Spegazzini meist 5—15 mm lang, 80—200 μ breit; ihre Struktur ist dieselbe wie bei Labecula (Spegazzini vergleicht sie sehr treffend mit einer Feder ohne Mittelrippe [„como las barbas de una pluma sin costilla central“]). Fruchthöhlungen kleiner als bei Labecula, 80—100 μ im Durchmesser, pyknotisch im Thallus gebildet; Spegazzinis Auffassung „los peritecios asientan sobre estas cintas“ ist unrichtig. Die Fruchtschicht war bei der mir vorliegenden Originalprobe noch nicht ausgereift; deshalb seien hier die betreffenden Angaben des Autors wiedergegeben.

„Asci obovati, brevissime crasseque pedicellati, aparaphysati; sporae oblanceolato-biconicae parvae hyalinae.“ — „Los ascos son trasovados de ápice obtuso y membrana gruesa con pedicelo muy corto (30=14 μ), sin parafises, con 8 esporas en 3 hileras; las esporas son casi bicónicas ó ligeramente lanceoladas incoloras, de extremos algo agudos (10=4 μ), con un tabique y una estrangulación que las dividen en dos células de igual longitud cadauna con dos grandes núcleos, de las cuales la superior á menudo es algo más gorda.“

Die kleineren Pyknothezien, sowie die kleinen Sporen trennen die Art sicher von Trichopeltina Labecula. — Da Spegazzini seinem Trichothyrium sarciniferum halbiert-schildförmige Gehäuse zuschrieb, kann die Einreihung vorliegender Art in die Gattung Trichothyrium auch nicht auffallend erscheinen, zumal die eigenartigen Thallusmembranen anscheinend gleich gebaut waren und erst wenige Vergleichsformen vorlagen.

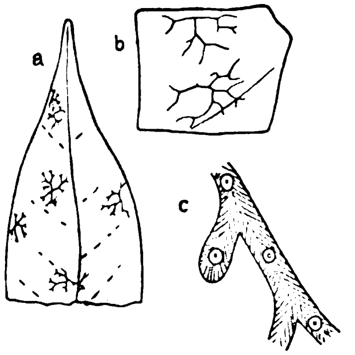


Fig. 5. Trichopeltina chilensit (Speg.) Th. a Habitus, nat. Größe; b zwei Thallus-Bänder, schwach vergrößert; c Stück eines Thallus-Fadens, stärker vergrößert. [Nach Spegazzini.]

2. Trichopeltella v. Höhn.

Fragm. z. Myk. X. no. 521.

(Sitz.-Ber. k. Akad. d. Wiss. Wien, math.-nat. Klasse, Bd. 119. I. 1910. p. 458.)

Omnia ut in Trichopeltina. Sporae phaeodidymae.

1. Trichopeltella montana (Rac.) v. Höhn. — l. cit.

Syn.: Trichopeltis montana Rac., Bull. Acad. sc. Cracovie 1909. p. 377.

Epiphyll auf Blättern von Vaccinium Teysmannianum auf dem Gedeh und Pangerango, häufig. (Taf. 1, Fig. 1.)

Raciborski beschreibt die Art wie folgt: „Epiphyt. Freie Hyphen fehlen. Wächst in einschichtigen, schwarzen, thallösen Lappen. Eine wachsende Zelle gabelt sich und bildet an der Spitze zwei nebeneinander liegende, viereckige, miteinander verwachsene Zellen, welche bei weiterem Wachstum entweder sich nur querteilen oder wiederum an der Spitze je zwei neue bilden. Dadurch entstehen anfangs längliche, an der Spitze abgerundete Lappen von mehreren Millimetern Länge und bis 0,15 mm Breite, die nachher hie und da am Rande in ähnliche, flache Lappen herauswachsen. Bei längerem Wachstum stoßen diese Lappen mit den Rändern aneinander, 0,5—2 cm breite, runde, schwarze Rasen bildend, oder sogar die ganze Blattfläche mit einer dünnen Kruste bedeckend. Unterhalb des einschichtigen Thallus bilden sich an sehr zahlreichen Stellen Perithezien (welche also nicht frei stehen), deren Mündungen flach, nicht vorragend, rundlich und durchscheinend sind. Thallus an der Stelle der Perithezien flach gewölbt und dunkler gefärbt. Paraphysen fehlen.

Die rechteckigen, braunschwarzwandigen Zellen des einschichtigen Thallus 2,5—5 μ breit, 5—10 μ lang . . . bei dem Wachstum zu ununterbrochenen, konvergierenden Antiklinen angeordnet, ganz so wie die Rosanowsche, von Sachs reproduzierte Zeichnung des Thallus von Melobesia

Lejolisii. Scheitel ganzrandig, halbkreisförmig, 40—150 μ breit. . . . . Perithezien bedeckt bleibend, 170—200 μ breit, flach konvex, mit je einer rundlichen kleinen apikalen Öffnung. Asci keulenförmig, zylindrisch, gerade oder häufiger gebogen, 8—10 μ breit, 36—50 μ lang, achtsporig. Sporen zweizellig, glatt, langoval, 3—4 μ breit, 11—14 μ lang, hellbraunwandig."

Die Struktur des Thallus stimmt genau mit derjenigen bei Labecula überein; auch die Pyknothezien werden auf dieselbe Weise gebildet, nämlich durch Verdichtung des Thallus, nicht „unterhalb" desselben, wie oben angegeben.

3. Trichopeltis Speg.

Fungi Puiggariani no. 364.

(Boletin Acad. nac. cienc. Cordoba, Buenos-Aires, 1889. p. 571.)

Sporae hyalinae, biseptatae. Reliqua ut in Trichopeltina.

1. Trichopeltis pulchella Speg. — l. cit. — Sacc. Syll. F. IX. p. 1068.

Epiphyll auf lebenden Myrtazeen-Blättern; Apiahy, São Paulo, Südbrasilien. (Taf. I, Fig. 2.)

Die Thallusbänder überziehen die Blattoberfläche in feinen, unregelmäßig verzweigten braunen Linien, in welchen die Pyknothezien durch runde, 60—110 μ breite, schwarze Wölbungen angedeutet sind. Mikroskopisch betrachtet ergibt das Band (vitta) ein Bild, wie es Fig. 2 darstellt. Der aus breiteren Zellen bestehende axilläre Strang ist etwa 50 μ breit, die antiklinen Flanken mit ihren graugrünen, schmalen, parallelen Hyphen beiderseits je etwa 60—70 μ (diese Maße sind natürlich veränderlich und können nur beispielsweise gegeben werden; jedenfalls bleibt die von Spegazzini angegebene Breite von 80—100 μ unter dem Durchschnitt). Der ganze Thallus besteht aus einer einzigen Zellage, mit Ausnahme der Fruchthöhlungen, ihre Struktur ist in der Einleitung näher beschrieben worden. Peripherisches Gewebe sehr zart septiert, aus lang rechteckigen, 10=4 μ messenden Zellen bestehend; zentrales Gewebe derber, mit 4—6 μ breiten Zellen. Pyknothezien durchgehends kreisrund, mit rundlicher, 10 bis 12 μ großer apikaler Öffnung (untypisches Ostiolum, durch Zellresorption nachträglich gebildet), im Durchschnitt flach-konisch.

Asken erst spärlich entwickelt, kurz bauchig, mit breitem Außenmantel, oben gerundet, unten in einen kurzen, fußförmigen Knoten verengt, 25—28 = 14—16 μ. Paraphysen fehlen. Sporen farblos, acht im Schlauch, zwei- bis dreireihig, 10—12=3—3½ μ, dreizellig (anscheinend noch sehr jung); die Mittelzelle ist ungefähr quadratisch, die beiden äußeren etwas gedehnt.

Die Beschreibung der Thallusbänder lautet nach Spegazzini: „Vittae vel taeniolae myceliales e puncto centrali oriundae stellatim vel irregulariter effusae parce flexuosae longiusculae atque latiusculae (2—12 = 0,08—0,1 mm) tenuissime membranaceae, parcissime ramulosae, rarius subcrustaceo-intricatae, utrinque subattenuatae, fusco-olivaceae, matrici arcte adnatae, prosenchymaticae, contextu e centro taeniolae (non costato-incrassato) marginem versus arcuato-expanso vel rectiusculo septulato, cellulis saepius 1-guttulatis, donatae."

2. Trichopeltis (?) reptans (Berk. et Curt.) Speg. — Fungi Puigg. no. 364; Sacc. Syll. F. IX. p. 1068.

Syn.: Asterina reptans B. et C. — Proc. Linn. Soc. X. p. 373; Syll. F. I. p. 46.

[Non Trichopeltopsis reptans (B. et C.) v. H.!]

Auf Blättern von Piper sp., Cuba (lg. Wright).

Exsicc.: Fungi Cubenses Wrightiani 734, 611. (Taf. I, Fig. 2, 4, 6.)

Über diese Art wurde schon in den Annal. mycol. 1912. p. 28 vom Verf. berichtet. Die Ausführungen v. Höhnels über Asterina reptans = Trichopeltopsis reptans (B. et C.) v. H. beziehen sich, wie gesagt, auf Trichothyrium dubiosum (Bom. et R.) Theiss. = Trichothyrium fimbriatum Speg. in Rick, F. austro-am. no. 66, welches irrtümlich als Asterina reptans ausgegeben wurde.

„Nach dem Original (identisch mit F. Cub. Wright. 734) bildet der Pilz auf der Blattoberseite schwarze, gewundene, unregelmäßig anastomosierende Linien, die sich bei schwacher Vergrößerung als braunschwarze, 100—200 μ breite, flache Bänder darstellen. Aus kleinen kreisrunden, radiärzelligen Membranen ihren Anfang nehmend, wachsen sie linear aus, wobei die inneren Zellreihen von der Mitte aus in geschweiften Bogenlinien sich dem Rande zuwenden und dort zu beiden Flanken in einen schmalen, etwa 30—40 μ starken antiklinalen Saum übergehen; seitlich entstehen dann häufig rundliche Ausbuchtungen wie bei Trichopeltis montana und Trichopeltis Labecula. Die Teilzellen dieser Membranen sind rechteckig, durchschnittlich 8—10 = 3—4 μ groß, die des zentralen Stranges gewöhnlich etwas derber, an den zur Peripherie leitenden Krümmungspunkten meist verkürzt. Die Perithezienanlagen kennzeichnen sich durch tiefschwarze, flach-konische Vorwölbungen der Membran von ungefähr 150 μ Durchmesser, die am Scheitel durchstochen sind und aus kürzeren, fast kubischen Zellen mit derber dunkler Wandung aus der Membran gebildet werden; Ostiolum nicht typisch rund, sondern durch Ausfall einiger apikaler Zellen entstehend. Weder am Original noch an den übrigen Exemplaren der F. Cub. Wrightiani konnte ich Asken auffinden, wie auch Spegazzini sein Exemplar steril fand.“ (Th. a. a. O.)

Über eine mutmaßliche Konidialform äußerte ich mich damals:

„Außer den geschilderten Bandmembranen treten bei Asterina reptans noch andere, ganz gleich gebaute Membranen auf, die sich jedoch schon bei schwacher Vergrößerung durch weit größere Maschen unterscheiden. Dieselben bestehen aus ungefähr doppelt so breiten, ca. 10 = 5—6 μ großen Zellen; ihnen entspringen zahlreiche hellbräunliche, abstehende, pfriemliche Borsten von Antennaria-Struktur, deren tonnenförmige Teilzellen, am Grunde etwa 18 = 12 μ groß, sich nach oben verjüngen. Die überraschende Gleichförmigkeit dieser beiden Membranformen, die aber durchaus nicht ineinander übergehen, legt es nahe, in letzterer die Konidialform zu vermuten; diese wäre dann eine Nebenfruchtform, die auch dem Thallus nach vollständig neben der Askusfruchtform bestände, da beide ohne Übergänge immer scharf unterschieden sind. Diese Vermutung wird durch den Umstand verstärkt, daß von den 12 Kollektionen von Asterina reptans im Herbar Kew (die zwar generisch, aber nicht alle spezifisch identisch sind) sieben diese großzelligen Membranen aufweisen, meist gleichzeitig mit der anderen Form, so daß also ein Zusammenhang beider nicht unwahrscheinlich ist.“ (Ibidem.)

Letztere Ausführung möchte ich jetzt nicht mehr unterschreiben und neige mehr dazu, diese großmaschigen Membranen mit den ihnen entspringenden Torula-Hyphen als etwas der Trichopeltis Fremdes anzusehen. Sicher zugehörig ist die Leptothyrium-Fruktifikation, die sich auf mehreren Kollektionen findet: dieselbe unterscheidet sich von der askusreifen durch kleinere Pyknothezien, stimmt aber im Bau der Membran mit der Askus-Generation überein!

Bevor nicht im nördlichen Südamerika auf derselben Nährpflanze Exemplare mit reifer Askus-Fruchtschicht gefunden werden, läßt sich über die Stellung des Pilzes nichts Sicheres aussagen; seine Diagnose auf Grund anscheinend identischer Kollektionen auf anderen Nährpflanzen vervollständigen wollen, ist aussichtslos, da bei der Ähnlichkeit der Thallusbänder ein sicheres Urteil über die spezifische Übereinstimmung unmöglich ist.

Von den in den Herbarien vorliegenden, als Asterina reptans bezeichneten Kollektionen wurden folgende nachgeprüft:

1. Fungi Cubenses Wrightiani 611, aus Cuba.

Ist gleich dem Typus 734, ebenfalls unreif.

2. Fungi Cubenses Wrightiani 409 auf Clusia, aus Cuba.

Ist Trichothyrium dubiosum (Bom. et R.) Th.

3. Blätter von Panax arboreum, New Zealand, lg. Colenso no. 302 (Kew).

Enthält Spuren von Asterina pulla Lév., außerdem eine Trichopeltee im Leptothyrium-Stadium, die mit Leptothyrium Panacis Cooke übereinstimmt, soweit die dürftige Originalbeschreibung ein Urteil zuläßt (Grevillea XIV. p. 129; Sacc. Syll. X. p. 414). Die Bacillusartigen Konidien sind farblos, 8 μ lang, kaum 1—1½ μ breit, leicht gekrümmt. Die zugehörigen Pyknothezien sind leicht gewölbt, 50—80 μ im Durchmesser.

4. Blätter von Panax arboreum, Kaitoke, North Islands, lg. I. K. no. 260 (Kew).

Enthält nur die oben erwähnten großmaschigen Membranen mit Torula-Hyphen.

5. Blätter von Knightia excelsa, New Zealand, lg. Colenso no. 214 (Kew).

Wie vorige.

6. Blätter von Knightia excelsa, North Islands, lg. I. K. no. 280 (Kew).

Enthält Trichopelteen-Thallus, unreif.

7. Blätter von (?), New Zealand, lg. Colenso no. 216 (Kew).

Wie 4.

8. Blätter von Melicytus ramiflorus, New Zealand, no. 231 (Kew).

Wie 4.

9. Blätter von Hedycarya dentata, New Zealand, lg. Colenso no. 163 (Kew).

Stellt eine neue Gattung mit vierzelligen hyalinen Sporen dar, s. unten.

10. Blätter von Brachyglottis repanda, New Zealand, lg. Colenso no. 147 und no. 312 (Kew).

Unreif.

11. Blätter von Astelia, North Islands, lg. I. K. no. 303 (Kew).

Thallus feinmaschiger wie bei reptans, unreif.

12. Blätter von Griselinia, New Zealand, lg. Colenso no. 250 (Kew).

Enthält nur die Leptothyrium-Fruktifikation; Konidien stabförmig, farblos, 8—10=1—1½ μ.

13. Blätter von Rhipogonum scandens, New Zealand, lg. Colenso no. 182 (Kew).

Unreif; mit Torula-Hyphen.

14. Blätter von Tasmania aromatica, Tasmanien (Kew).

Schlecht entwickelt und ganz unreif.

NB.: Über vorstehende Kollektionen berichtete M. C. Cooke in summarischer Weise in Grevillea XIV. p. 130: „Asterina reptans B. et C. — Stylospores cylindrical, slightly curved, almost linear (10=1 μ) hyaline. — This condition would fall into the Leptostromaceae perhaps as a species of Leptothyrium rather than Melasmia, to either of which it is allied. — Common on various coriaceous leaves, such as Panax, Knightia etc., New Zealand.“

15. Ule, F. brasil. no. 474 und 393 auf Piper, Sta. Catharina, Südbrasilien (Herb. Pazschke [cfr. Hedwigia 1892. p. 103]).

Ist Trichothyrium dubiosum (Bom. et R.) Th.

16. Blätter von Drypetes sp., Martinique, lg. Duss no. 242 und 453 (Herb. Berlin sub Microthyrium reptans).

Ist Peltistroma juruanum P. Henn.

17. Blätter von „Amandier“, Guadeloupe, lg. Duss no. 242 (Herb. Berlin).

Enthält nichts Beschreibbares mehr.

18. Ule, Mycotheca brasil. 65 auf Laurazee (in verschied. Herb.) ist Peltistroma juruanum P. Henn.

19. Ule, Amazonas Exped. 3126, Rio Juruá, auf Laurazee, wie vorige.

20. Asterina reptans ohne sonstige Angaben (Herb. Paris) ist dieselbe Kollektion wie Fungi Cubenses Wright. no. 409 auf Clusia und enthält Trichothyrium dubiosum.

Aus der Gattung Trichopeltis sind auszuschließen Trichopeltis ferruginea Rehm und Trichopeltis obtecta Rehm (Calonectria in Hedwigia 1900. p. 225; Trichopeltis in Hedwigia 1905. p. 1; Cryptopeltis in Ann. myc. 1906. p. 409), da sie nach v. Höhnel (Fragm. z. Myk. VII. no. 324) zu den Flechten gehören, bestehend aus Calonectria und einer Grünalge aff. Phycopeltis.

4. **Trichopeltula Theiss.** n. gen.

Ut Trichopeltina. Sporae hyalinae, 4-cellulares.

1. Trichopeltula Hedycaryae Theiss. n. sp.

Auf Blättern von Hedycarya dentata, New Zealand (lg. Colenso sub no. 163; Herbar Kew sub Asterina reptans B. et C. (Taf. I, Fig. 3.)

Epiphylla. Thallus vittaeformis, repens, ramosus; vittae brunneo-atrae, 50—90 μ latae, radiato-prosenchymaticae, cellulis anguste rectangularibus. Pycnothecia in thallo formata, alia conidiofera 50 μ, alia ascofera 80—100 μ diametro, applanato-hemisphaerica, demum apice perforata. Conidia bacillaria, hyalina, continua, 7—8=1—1½ μ. Asci aparaphysati, octospori, obclavati, supra late rotundati, infra in nodum brevissimum coarctati, 25—30=16—18 μ. Sporae tristichae, hyalinae, oblongae, subcurvatae, 13—15=2½—3 μ, triseptatae; cellulae mediae subcubicae, extremae subconice attenuatae.

Das Original ist teilweise mit einem braunschwarzen, dichten, weichen Überzug kontinuierlich bedeckt, der aber zum geringsten Teile von dem beschriebenen Pilz herrührt. Neben den bei Trichopeltis reptans erwähnten großmaschigen Membranen mit Torula-artigen, aufrechten Hyphen beteiligt sich an dem Überzug hauptsächlich eine Pleomeliola (sensu Sacc., Syll. I. p. 70) mit rauhen, schwarzen, im Alter deutlich ostiolierten Gehäusen, die an der Basis der Kutikula leicht eingesenkt erscheinen und mit einem Kranz von hellbraunen Borsten besetzt sind; die paraphysenlosen bauchigen Schläuche bergen acht olivenfarbene Sporen, die meist quer in vier Zellen geteilt sind, mit einer Längswand in den beiden mittleren, und 26—30=10—12 μ groß sind. Sowohl unter diesem Überzug als auch außerhalb desselben, frei auf dem Blatt sichtbar, verlaufen die zierlichen Bänder der Trichopeltula in fast haarförmigen feinen Linien (die bedeutend zarter erscheinen als bei reptans). Auch mikroskopisch unterscheiden sich die Membranen von denen der Tr. reptans durch zartere Hyphen. Der Zentralstrang (Taf. I, Fig. 3) ist etwa 40—45 μ breit und besteht aus bogig-geschweiften, aufsteigenden Hyphenreihen mit 6—10 μ langen, 2½ bis 3½ μ breiten, rechteckigen Zellen. Wie bei Trichopeltis pulchella geht der Zentralstrang dann plötzlich in scharfem Bogen in den antiklinen Saum über, der aus palisadenartig angeordneten, parallelen, kaum 2—2½ μ breiten Hyphen besteht und beiderseits eine Breite von nur etwa 18—20 μ besitzt.

Pyknothezienbildung wie bei Trichopeltina und Trichopeltis. Die kleineren, 50—80 μ großen Höhlungen enthalten die an farblosen Hyphenbüscheln entstehenden Leptothyrium-Konidien.

Das Material wurde 1885 von Colenso zusammen mit den bei Trichopeltis reptans erwähnten Kollektionen auf Neu-Seeland gesammelt.

5. Brefeldiella Speg.

Fungi Puiggariani no. 344.

(Boletin Acad. nac. sc. Cordoba, Buenos-Aires, 1889. p. 558.)

Thallus membranosus superficialis, radiato-prosenchymaticus, primo orbicularis, dein pluribus connascentibus irregulariter lobato-extensus. Pycnothecia in thallo formata, orbicularia vel subelliptica. Asci aparaphysati. Sporae hyalodidymae.

1. Brefeldiella brasiliensis Speg. — l. cit. (Januar 1889); Sacc. Syll. F. IX. p. 1063.

Auf lebenden Bambusblättern, Apiahy, São Paulo, Südbrasilien (Puiggari 2356).

Syn.: Brefeldiella subcuticulosa (Cooke) Theiss. — Ann. myc. 1912. p. 16.
Asterina subcuticulosa (Cooke). Grevillea XVII (Juni 1889), p. 81.
Asterella subcuticulosa (Cooke). — Sacc. Syll. F. IX. p. 397.

Auf welken und toten Blättern von Olearia argophylla, Gippsland, Australien (Luehmann sine no.). Fig. 1, 3, 6. — Taf. I, Fig. 8.

Spegazzini charakterisiert seine Gattung wie folgt: „Perithecia dimidiato-scutata mytiliformia, postice loricato-confluentia, ostiolo rotundo vel subrimoso, contextu prosenchymatico-radiante atro donata; asci octospori; sporidia 1-septata hyalina.“ In dieser Diagnose ist unter „Perithecium“ der ganze Thallus verstanden, wie aus den Worten selbst hervorgeht und eine Handzeichnung auf der Etiquette des Originals bestätigt (vergl. Fig. 6 d). Die radiären Thallusmembranen werden in Form runder Scheibchen angelegt, welche radiär auswachsen und bald mit den benachbarten zusammenstoßend organisch ineinanderwachsen (d. h. derart, daß die beiderseitigen Hyphenreihen in offene Kommunikation treten und eine individuell einheitliche Membran bilden). Auf diese Weise können sich zahlreiche Anlagen verbinden, welche dann unregelmäßig-lappige Kollektivmembranen bilden; zuweilen können so auch bandartige Figuren entstehen (die aber dann mit den Bändern bei Trichopeltis usw. nicht gleichwertig sind!).

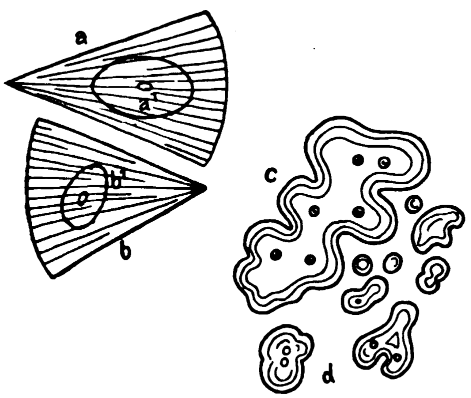


Fig. 6. Brefeldiella subcuticulosa (Cke.) Th. a Pyknothezium (a¹) radiär orientiert; b Pyknothezium (b¹) quer zur Hyphenrichtung orientiert; c Kollektiv-Membran und einzelne mehr oder zusammengewachsene Thallus-Scheiben; d Thallus-Lappen vor dem Zusammenschluß. [a—d tchematisch.]

Die Pyknothezienbildung erfolgt genau so wie bei Trichopeltina und Trichopeltis, indem in einem bestimmten Rayon (90—170 μ rundlich oder 150—180=120—150 μ elliptisch) die Zellwände stark verdickt werden und dann durch Auflagerung neuer Zellen nach oben eine mehrschichtige, kompakte Decke gebildet wird, die sich gleichzeitig nach dem Maße der fortschreitenden Entwicklung aufwölbt. Durch Zellresorption am Scheitel dieser Wölbung entsteht dann ein (untypisches) rundliches oder längliches Ostiolum. Obschon die Membranen kreisrund angelegt werden, befindet sich der Scheitelpunkt der Pyknothezien nicht in deren Zentrum, sondern auf einem Radius (Fig. 6 a u. b), analog wie bei Trichopeltis, Trichopeltina usw.; so erklärt sich der Ausdruck „ostiolo excentrico“ in Spegazzinis Artdiagnose. Die Membranzellen sind durchschnittlich im Umriß rechteckig, 8=4 μ, können sich aber auch in peripherischen Partien bis 12=3 μ strecken, während sie im Zentrum der Membranen und im Bereich der Pyknothezien nahezu kubisch werden. Daß die Lokalisierung der Verdichtungsstellen sehr willkürlich ist, ersieht man sowohl aus deren exzentrischer Lage innerhalb der Membran als auch aus dem Umstand, daß die Längsachse der Pyknothezien nicht mit der Hyphenrichtung zusammenzufallen braucht, sondern vielfach quer zu derselben steht (Fig. 6 b).

Schläuche ohne Paraphysen, kurz elliptisch rundlich, 20—24=16 μ oder etwas länglich bis 30—35=10—14 μ, sehr kurz gestielt. Sporen zwei- bis dreireihig, farblos, 10—13=4 μ, in der Mitte geteilt und leicht eingeschnürt, beiderseits abgerundet (noch nicht ganz ausgereift), Oberzelle etwa breiter als die untere.

Asterina subcuticulosa Cooke, welche ein halbes Jahr später als die Spegazzinische Art veröffentlicht wurde, ist nicht, wie jene, parasitisch infiziert und darum regelmäßiger und klarer entwickelt, im übrigen identisch. Dieselbe Art findet sich auch, leider unreif, in Kew unter den unbestimmten Arten („unnamed“) aus Melbourne (lg. Campbell 405 und 410) auf Bambus (?). Die Thallusanlagen verschmelzen hier großenteils zu weit ausgedehnten, durch die (unreifen) Pyknothezien ziemlich dicht punktulierten Überzügen.

6. Pycnocarpon Theiss.

Die Gattung Asterina p. 31.
(Abhandl. k. k. zool.-bot. Gesellsch., Wien, Bd. VII. Heft 3. 1912.)

Thallus superficialis consistens ex membranis simplicibus (strato cellularum unico), prosenchymatico-radiantibus, orbicularibus, confluentibus, in centro stratoso et elevato pycnothecia formantibus. Pycnothecia in thallo formata (cellulis ipsius crebrius divisis et incrassatis) rima longitudinali (ostiolo non typico) dehiscentia. Asci aparaphysati. Sporae phaeodidymae. Receptacula pycnotheciis similia producunt pycnoconidia atra continua.

1. Pycnocarpon magnificum (Syd. et Butl.) Th. — l. cit.
Syn.: Asterina magnifica Syd. et Butl. — Annal. myc. 1911. p. 391.

Auf Blättern von Terminalia sp., Moulmein, Burma, Ostindien (lg. E. J. Butler). Fig. 7. — Taf. I, Fig. 5 u. 7.

Die Unterseite der Blätter ist mit schwarzen runden Scheibchen besetzt, die meist dicht gedrängt stehen, vielfach selbst zusammenhängende Häutchen bilden. Dieselben wachsen ganz oberflächlich und lassen sich im Alter durch leichte Berührung schon absprengen. „Die Membranen bilden ein fast 1 mm großes Häutchen, von ungefähr kreisförmigem Umfang, aber peripherisch vielfach ausgebuchtet und in verschiedener Weise ineinander überfließend (wie bei Brefeldiella). Das Zentrum ist aus rundlich-polygonalen, 8—10 μ großen Zellen gebildet, die sich nach außen hin in meist fächerartig divergierenden Radialreihen in rechteckige 16—50 μ lange Glieder fortsetzen; die Breite der Hyphen beträgt etwa 4—5½ μ. Die ganze Membran ist durchscheinend hellbräunlich und zeigt höchstens an den peripherischen Enden der Hyphenreihen leichte Verdickungen der äußeren Zellwand.

Die Fruchthöhlung (Perithezium) entsteht dadurch, daß ungefähr in der Mitte eine Membranpartie sich leicht emporwölbt, wobei die rundlich-polygonalen Zellen eine starke Verdickung der Wände erfahren und der Kontext dadurch opak schwarz wird. Bei den „Pykniden“ ist diese Partie kreisförmig, sehr bald durch ein zentrales rundes, 25—40 μ großes Loch geöffnet, bei den askogenen Membranen aber von elliptischem bis linearem Umfang, etwa 90—120 = 40—60 μ, bedeutend stärker verdichtet als bei den Pykniden, wo wenigstens noch das Lumen der Einzelzellen erkennbar ist; die Öffnung dieser askogenen Perithezialhöhlen erfolgt durch einen unregelmäßigen Längsspalt.

Die Pyknokonidien sind länglich-keulig, mandelförmig, 42—70 = 18—22 μ, schwarzbraun, einzellig. Die Asken wechseln zwischen kugelig 85—100 μ Durchmesser und breit zylindrisch gestreckt 140 = 40 μ, in letzterem Falle stellenweise durch die Lage der Sporen bis 65 μ bauchig gedehnt; sie ent-

Digitized by Google · Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

halten 4—8 schwarzbraune längliche Sporen von 45—55 μ Länge; die Oberzelle ist meist breiter, 23—25 μ, die Unterzelle von ungefähr gleicher Länge, 20—22 μ breit. Paraphysen sind nicht vorhanden. Jod färbt die Asken intensiv blau.

Über die Membranen hin ziehen sich reichliche, freie, braune Hyphen von 6—8 μ Dicke; dieselben verlaufen geradlinig und sind locker gegenständig verzweigt, und ziemlich kurz septiert. Die Verzweigungen erfolgen typisch vom Ausgangspunkt zur Hyphenspitze hin in aufeinanderfolgenden Abständen von etwa 135, 80, 55, 27 μ, also im Verhältnis von 5 : 3 : 2 : 1 verkürzt; daneben finden sich auch regellos verteilte Zwischenzweige. Ganz eigenartig sind die an den Endpunkten der primären wie sekundären Zweighyphen auftretenden klammerartigen Gebilde, die teils längs, teils quer der Hyphenspitze aufsitzen, braun, einzellig und 30=18 μ groß sind . . ."

„Die Membranen sitzen der Blattoberfläche sehr lose auf und heben sich öfters peripherisch (durch Zusammenziehen bei Wasserverlust) von der Unterlage, sich etwas aufwärts krümmend, ab; so ist der in der Originaldiagnose gebrauchte, leicht mißverständliche Ausdruck „margine elevato" zu verstehen." (Theißen, a. a. O.)

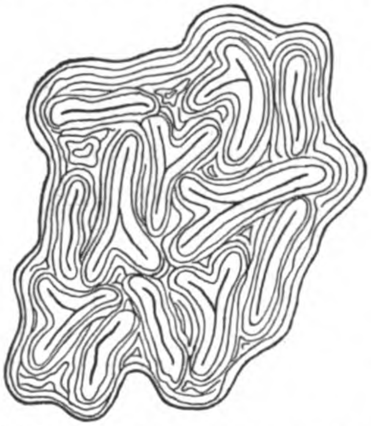


Fig. 7. Pycnocarpon magnificum (Syd.) Th. Kollektiv-Membran mit zahlreichen Pyknothezien [schematisch].

Die Membranen sind typisch kreisrund mit je einer Fruchthöhlung. Bei der großen Zahl von Sporen und Konidien jedoch, die massenhaft die Membranen bedecken, findet eine starke Aussaat neuer Lager auf engem Raume statt; die Folge ist, daß vielfach mehrere Membranen, bis zu 12 und mehr, schon in frühester Jugend ineinanderwachsen und schließlich eine einzige Kollektivmembran bilden, in welcher nun auch mehrere Pyknothezien entwickelt werden (Fig. 7). Da bei reifen Pyknothezien die Kämme der steilen Aufwölbungen 0,08—0,2 mm hoch sind, nimmt sich ein solches Lager bei schwacher Vergrößerung nnter dem Mikroskop wie eine mächtige Gebirgskette aus. Der Umfang einzelner Pyknothezien kann bis zu 1 mm Länge und ½ mm Breite betragen.

Tafelerklärung.

Fig. 1. Trichopeltella montana (Rac.) v. H. Original. Vergr. ca. 11.

Fig. 2. Trichopeltis reptans (B. et C.) Speg. F. Cub. Wright. no. 611. Vergr. ca. 11.

Fig. 3. Trichopeltula Hedycaryae Th. Vergr. ca. 400. a Mittelstück eines Thallus-Fadens; b zwei Asken; c Sporen; d Leptothyrium-Konidien.

Fig. 4. Asterina reptans auf Panax arboreum (I. K. 260); Vergr. ca. 11.

Fig. 5. Pycnocarpon magnificum (Syd.) Th.; Mycelstück; Vergr. ca. 400.

Fig. 6. Asterina reptans (Colenzo 163); Vergr. ca. 11.

Fig. 7. Pycnocarpon magnificum; Asken und Sporen; Vergr. ca. 400.

Fig. 8. Brefeldiella brasiliensis Speg., Original; Vergr. ca. 4.

Nachdruck verboten.

Zur Geschichte und Entstehung des Obstbaumkrebses.

Von Dr. **Ernst Voges.**

Mit 4 Textfiguren.

Historisch-Kritisches.
Der Obstbaumkrebs der Nectria ditissima Tul.
  Die Krebswunde.
  Die Überwallungswülste der Krebswunde.
  Die Entstehung der Krebswunde.
  Die parasitären Pilze der Krebswunde.
  Empfänglichkeit der verschiedenen Obstsorten für die Krebskrankheit und die Immunität.
Allgemeine Ergebnisse.

I.

Historisch-Kritisches.

Wie die Geschichte der Wissenschaften lehrt, so führt der Weg der Erkenntnis durch ein Wirrnis der Irrtümer. Und am häufigsten geht der forschende Menschengeist fehl auf den spurlosen Gängen des Kausalnexus, auf der Pfadsuche zwischen Ursache und Wirkung in der Erscheinungswelt. So war es auch bei der Auffindung der verae causae des Baumkrebses. Eine ganze Anzahl in- und ausländischer Forscher hat sich damit beschäftigt. Aber nur die Hauptarbeiten sollen in unserem historischen Exkurs kurz Erwähnung finden.

Als R. Goethe[1]) im Jahre 1877 nach mehrjährigen Krebsstudien seine Mitteilungen „über den Krebs der Apfelbäume" veröffentlichte, da war er, wie Goethe später in einer anderen Arbeit[2]) berichtet, zu dem Resultat gekommen, daß der Frost die direkte Ursache aller echten Krebswunden sei, für welche bekanntlich die um einen Ast oder eine Knospe als Mittelpunkt konzentrisch gestellten Wundränder charakteristisch sind. Die Einwirkung parasitischer Pilze, so ein in der Oberfläche der Wunden vorgefundenes Fusisporium war nach unserem Forscher ausgeschlossen. Auf dem Pomologenkongreß in Potsdam 1877 hielt man dann seiner vorgetragenen Ansicht mit Recht entgegen, daß der Krebs außer dem Frost noch andere Ursachen haben müsse, da er auch in Italien häufig sei, wo doch der Frost eigentlich nicht in Frage käme. Als dann R. Goethe im Sommer 1878 eine Krebswunde um ein Auge eines Apfelfrühjahrstriebes fand, an welcher Wunde in der feuchten Kammer die Stromata des Fusidium candidum Willk. erschienen, ein Befund, ergänzt durch weitere junge und alte Krebswunden mit den gleichen Konidienlagern und späterhin von den Perithecien der Nectria ditissima Tul. bedeckt — da war damit die Spur zur Erkennung des Krebserregers gegeben. Es bedurfte nur noch, um ganz sicher zu gehen, der experimentellen Bestätigung, daß tatsächlich jene beiden Pilzformen die gefährliche Baumkrankheit hervorrufen. Es handelte sich um die Alternative: „Entweder siedelte sich die Nectria sehr häufig auf den schon entwickelten Krebswunden an, oder aber sie erzeugte den Krebs als echter Parasit".

---

[1]) Mitteilungen über den Krebs der Apfelbäume. Leipzig 1877.

[2]) Weitere Mitteilungen über den Krebs der Apfelbäume. (Landwirtsch. Jahrb. Bd. 9. 1880. p. 837.)
Zum Krebs der Apfelbäume. (Botan. Ztg. 1884. No. 25.)
Über den Krebs der Obstbäume. Berlin 1904.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

So wurden denn Infektionsversuche unternommen. Mycelhaltige Krebsrindenstückchen, in einjährige Apfeltriebe geimpft, ergaben keine Krebswunden. Dahingegen entstanden diese unter ruckweisem Einsinken der ergriffenen Rindenpartien, sobald Nectria-Askosporen in Rindenschnitte gebracht waren. Diese Erscheinung, daß sich die keimenden Sporen, Askosporen wie Konidien, virulenter erweisen, als das Mycel, kann man mehrfach beobachten bei Infektionsversuchen, und gerade mit Fusariumsporen. Worauf das jedoch beruht, ob etwa die Sporenkeimlinge bei dem Angriff auf die Zellmembran ein wirksameres Enzym abscheiden, das wissen wir nicht. Sonst heißt es ja, daß das Mycel durch eine saprophytische Ernährung um so gekräftigter zum parasitären Angriff ausgerüstet sei, was hier aber nicht zutrifft. Es ergab sich bei den Infektionsversuchen Goethes nun ferner, daß die Keimschläuche sowohl der Konidien, wie der Schlauchsporen in die unverletzte Rinde der unter Wasserverschluß gehaltenen Triebstücke eindrangen, vorzugsweise durch die Lentizellen. Das Mycel verbreitete sich gleicherweise in der Rinde wie im Holz, indem die Hyphen zuerst in die Markstrahlen drangen und sich von da aus, die dickwandigen Holzfasern mehr bei Seite lassend, der Gefäße bemächtigten. An Apfelzweigen im April im Freien vorgenommene Infektionen mit Konidien und Askosporen auf verletzte und unverletzte Rindenstellen hatten das Ergebnis, daß nur die Konidieninfektionen in Rindenschnitte die charakteristischen Krebswunden erzeugten. Auf Blättern verursachten die Keimschläuche der Konidien wie der Askosporen braune Wundstellen und Löcher. In seiner Arbeit aus dem Jahre 1880 macht Goethe sodann darauf aufmerksam, daß die zugeführten Konidien und Askosporen an den Vorsprüngen der Knospenwinkel hängen bleiben und Keimschläuche treiben können, die in die Rinde bzw. die Lentizellen auch ohne Rindenverletzung einzudringen vermögen.

Was nun das ursprüngliche Unverletztsein solcher vom Pilz befallenen Rindenpartien betrifft, so ist hierüber ohne weiteres keine Entscheidung zu treffen. Wenn man jedoch bedenkt, daß dem bloßen Auge, sowie der Lupenvergrößerung die kleinsten Rindenrisse entgehen, die aber für die Keimschläuche der Pilzsporen zum Eindringen in den Gewebekörper noch groß genug sind, so ist eher anzunehmen, als ausgeschlossen, daß sich solche mikroskopischen Rindenverletzungen gerade in der Umgebung der Knospen vorfinden, die ja aus dem Achsenorgan hervorbrechen, wobei es ohne eine Gewebslockerung und Sprengung der Umgebung nicht abgeht. Dazu kommt, daß Insekten, so u. a. die Pflanzenläuse, die mit Vorliebe die Deckung und Schutz gewährende Umgebung von Knospen aufsuchen, hier dem bloßen Auge nicht erkennbare Stich- und Fraßwunden hinterlassen, welche als Eingangspforten für den Pilz dienen können. Wenn schon der Organismus die verschiedenen Rindenverletzungen durch eine alsbaldige Wundkorkbildung zu schließen sucht, so entstehen doch immer wieder infolge des fortschreitenden Knospenwachstums und der durch abwechselnde Trockenheit und Regen hervorgerufenen ungleichen Gewebespannungen feine Risse, welche von den keimenden Sporen als offene Türen benutzt werden.

Zu der in seiner ersten Arbeit vertretenen Ansicht, wonach der Frost der einzige Urheber des Krebses sein sollte und die Einwirkung von Pilzen ausgeschlossen, bemerkt Goethe, daß er diese Anschauung nicht mehr aufrecht erhalten könne und die Nectria ditissima als eine zweite direkte Ursache des Krebses der Apfelbäume anerkenne.

Um dieselbe Zeit, als sich Goethe mit dem Apfelbaumkrebs beschäf-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

tigte, befaßte sich Robert Hartig[1]) mit Untersuchungen über den Krebs der Laubholzbäume. Er fand, daß Nectria ditissima in der Regel nur durch Wundstellen, zumal Hagelschlagwunden, in das Rindengewebe der Bäume gelangt und den Krebs verursacht. Doch konnte er auch wie Goethe junge Blätter durch Konidien und Askosporen infizieren. Seltener tritt nach Hartig eine Krebsbildung durch Frost auf. Ist die Krebswunde knollenartig überwallt, so spricht man vom geschlossenen Krebs, liegt sie frei, vom offenen. Die hintereinander gelegenen Überwallungsränder der Wunde kommen nach Hartig dadurch zustande, daß der Pilz in der Vegetationsruhe weiterwächst und den Gewebekörper zerstört, sein Wachstum aber in der Vegetationsperiode einstellt, während der befallene Gewebekörper den erlittenen Gewebsverlust durch Neubildungen zu ersetzen sucht, die hinterher wieder von dem neu einsetzenden Pilzwachstum zerstört werden. — Bei der Krebswunde der Apfelbäume trifft dieses auf die Vegetationsruhe beschränkte Wachstum des Krebspilzes jedoch nicht zu. Denn nicht nur, daß die Perithecienfruchtform der Nectria ditissima in der Vegetationsperiode anzutreffen ist, auch die Konidienfruchtform des Pilzes erscheint im Sommer in üppigen Vegetationen in der Krebswunde. Aber das schließt nicht aus, daß wir es bei ihm mit einem bestimmten intervallmäßigen Wachstum zu tun haben.

Die experimentellen Befunde Goethes über die Krankheitsursache des Obstbaumkrebs wurden dann im Jahre 1892 von N. Lapine[2]) erweitert und bestätigt. Er fand, daß von 120 krebsigen Trieben 115 die Nectria ditissima aufwiesen; bei 15 erschienen weder Konidien, noch Perithecien des Pilzes. Doch hat Lapine die Krebswunden nicht auf Mycel untersucht. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß dieses vorhanden war. Nectria-Perithecien in der Kultur zu erzielen, gelang nicht. Auf dem natürlichen Substrat, einem Apfelbaumtriebteil, mit Konidien in Rindenschnitte geimpft und unter Wasserverschluß gebracht, erhielt dahingegen R. Goethe nach zehn Wochen Nectria-Perithecien. Ende Juni mit Konidien vorgenommene Infektionsversuche an Apfel-, Birnen-, Kirschen- und Zwetschentrieben zeigten, daß das Nectria-Mycel das Rinden- und Holzgewebe durchwucherte und in gesunde Zellen eingedrungen war. Auch Lapine fand, daß die Keimschläuche in die unverletzte Rinde zu dringen vermögen. Wurde die Kommunikation der Rinde durch Ringelschnitte unterbrochen und die verletzten Triebe über den ersten Knospen unterhalb der Ringelschnitte geimpft, so kam das Pilzmycel an den Knospen unterhalb des Ringelschnitts hervor, nicht aber an den Knospen oberhalb des Ringels, woraus Lapine schließt, der Pilz verbreite sich in der Rinde, um sodann an den Stellen, wo sich Knospen befinden, an die Oberfläche zu treten.

Diese Erscheinung findet vielleicht darin ihre Erklärung, daß das Pilzmycel von der Infektionsstelle aus sich zunächst in dem nahrungsreichen Rindengewebe verbreitet und dabei nach den gelockertsten und deshalb lufthaltigsten und sauerstoffreichsten Gewebepartien infolge einer aerotropischen Reizwirkung strebt und aus dieser lockergewebigen, brüchigen Rindenpartie in der Umgebung der Knospe zutage tritt.

---

[1]) Die krebsartigen Krankheiten der Rotbuche. (Zeitschr. f. Forst- u. Jagdw. IX. 1877.) — Der Krebs der Laubholzbäume. (Untersuch. a. d. forstbot. Instit. zu München. I. 1880. — Lehrb. d. Pflanzenkrankheiten. Berlin 1900. p. 80.)

[2]) Zum Krebs der Apfelbäume. (Landwirtsch. Jahrb. Bd. 21. 1892. p. 937.)

Die Impfversuche Goethes und Lapines wurden im Jahre 1900 ergänzt durch solche von R. Aderhold[1]). Allerdings experimentierte er nicht mit Nectria ditissima, sondern nach J. Weeses[2]) Feststellung mit N. galligena Bres. Aderhold verfolgte das Verhalten der im November mit Konidien in Verletzungen geimpften Rindenstellen. Bis zum Frühjahre zeigte sich äußerlich nichts von einem Impferfolge, nach dem Austreiben der Bäume sanken jedoch die Wundstellen napfartig ein, wuchsen bis Ende Juni, um dann im Wachstum stillzustehen und zu überwallen. Interessant ist Aderholds Befund, daß auf den Impfstellen bei Apfelzweigen sich bereits im Sommer Konidien einstellten, an den Steinobstimpfstellen aber solche überhaupt nicht erschienen, weshalb Aderhold meint, daß man es auf dem Steinobst nur oder doch in der Regel mit sterilem Nectria-Mycel zu tun habe. Brzezinski wirft dem gegenüber zwar nicht mit Unrecht die Frage auf, woher denn Aderhold wisse, daß das fragliche Mycel auch Nectria-Mycel sei. — Weshalb sich ferner keine Fruchtlager bei dem vermeintlichen Nectria-Mycel bilden, das bleibt noch festzustellen. Vielleicht hängt dies mit dem Gummifluß der Impfstelle zusammen.

Entgegen den bisherigen Anschauungen über den Krebserreger erklärt dann J. Brzezinski[3]), daß der Obstbaumkrebs nicht durch Nectria ditissima Tul., sondern durch ein Bacterium, das er Bacterium mali Brz. nennt, verursacht werde. Impfversuche mit dem Krebspilz seien resultatlos verlaufen. In einer scharfen Polemik[4]) gegen Aderhold, worin er seine Ansicht verteidigt, daß die äußeren Krebserscheinungen erst die Folge einer starken Entwicklung der Bakteriose in der Tiefe des Holzes sind, berichtet Brzezinski ferner, der Nectria-Pilz bilde auf künstlichen Nährböden nach einigen Wochen mit ungewöhnlicher Leichtigkeit große Pykniden, die mit unbewaffnetem Auge sichtbar seien. Und dieselben Pykniden fänden sich auch in der Natur vor. Daß diese bisher unbekannte Fruktifikationsform nicht bemerkt sei, zeigt nach Brzezinski, wie wenig Gewicht die früheren Forscher auf die Erkennung der wahren Natur des vermeintlichen Parasiten legten.

Nun, außer Brzezinski ist es wohl niemandem gelungen, so zahllose Kulturen von den verschiedenen Forschern auch angestellt worden sind, weder auf künstlichem Substrat, noch auf natürlichem, auf der Krebswunde, die Pyknidenfruchtform der Nectria ditissima Tul. zu entdecken. Auch mein Bemühen darnach war vergeblich. Und so steht denn diese Pyknidenentdeckung wie Brzezinskis bakterieller Obstbaumkrebs einstweilen ganz isoliert da!

Das Ergebnis seiner Krebsstudien faßt P. Sorauer[5]) dahin zusammen, daß jede Krebsstelle als Anfangsstadium eine bis auf das Kambium gehende, zumeist durch Frostwirkungen entstandene Wunde zeigt, die um die Zeit der höchsten vegetativen Achsentätigkeit entstand, da die Wundfläche durch üppige Überwallungsränder zu decken gesucht werde. Die nach außen hin zunehmende Dicke der Überwallungsränder erklärt sich dadurch, daß das von oben herabkommende plastische Material des noch belaubten Zweiges in jedem folgenden Jahre durch das Zurücktreten des Überwallungsrandes sich auf einen kleineren Teil des Zweig- oder Stammumfanges zu verteilen hat und demgemäß die immer kürzer werdende Kambiumzone mit relativ reichlicher Nährstoffmenge zu Neubildungen versieht. — Wenn diese Erklärung für das hypertrophische Dickenwachstum der Überwallungsränder richtig ist, dann müßte allemal der letztentstandene Wall der mächtigste sein. Das ist jedoch nicht der Fall, wie ein senkrechter Querdurchschnitt durch die Krebswunde lehrt. Die Überwallungsränder sind ungleich in ihrem Dickenwachstum. Außerdem würde man dabei gleichsam mit einem für die betreffende krebsige Zweigregion bemessenen Nährquantum rechnen, das nunmehr, sowie der Krebs bestimmte Zweigteile zerstörte, in Überschuß vorhanden wäre, was doch nicht gut angängig ist. Die innerhalb eines Sommers in der Krebswucherung auftretenden, abwechselnden dünnwandigen und dickwandigen Holzzonen bringt Sorauer in einen ursächlichen Zusammenhang mit feuchten und trockenen Witterungsperioden. Allein, welche Bedeutung der ungleiche Wassergehalt auf die Ausbildung der Holzelemente hat, so auch bei Frühjahrs- und Herbstholz, darüber herrschen die widersprechendsten Ansichten, so daß man gewiß mit Haberlandt[1]) sagen kann, in die periodisch wechselnden Wachstumserscheinungen ist uns vorläufig nicht der geringste Einblick gegönnt.

---

[1]) Impfversuche mit Nectria ditissima Tul. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 10. 1903. p. 763.)

[2]) Zur Kenntnis des Erregers der Krebskrankheit an den Obst- und Laubholzbäumen. (Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Österr 1911.)

[3]) Le chancre des arbres, ses causes et ses symptômes. (Bull. de l'Acad. des scienc. de Cracovie. Cl. d. scienc. mathémath. 1903, Mars.)

[4]) Einige Bemerkungen über die Krebs- und die Gummikrankheit der Obstbäume. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 12. 1904. p. 632.)

[5]) Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Bd. 2. 1909. p. 582.

Nach Sorauer soll ferner an einem diesjährigen, noch grünen Triebe die Krebsgeschwulst nie zu finden sein. Es berichtet R. Goethe indes, wie vorhin erwähnt, daß er im Sommer an einem im Frühjahr entstandenen Seitentriebe eines jungen Apfelhochstammes echte, nicht auf Frostwirkungen zurückführbare Krebsanfänge mit dem charakteristischen Mittelpunkte, in diesem Falle einem Auge, gefunden habe. Wennschon Sorauer weiter zugibt, daß man von einem Pilzkrebs sprechen könne, so will er aber den Pilz nicht als spezifischen Erreger von Krebsgeschwülsten gelten lassen, zumal man auch Nectria ditissima an Zweigen gefunden habe, ohne daß der Pilz irgendwelche krebsige Wucherungen veranlaßte. Der Parasit sei nicht imstande, eine unverletzte Achse anzugreifen. Es ist nun allerdings auffällig, daß bei den Impfversuchen Goethes und Lapines die Infektionen an der unverletzten Rinde im Freien versagten, während sie im Zimmer gelangen. Sodann stellt Sorauer die Ansicht auf, daß bei flächenartig ausgebreiteten Frostwunden sich die Nectria ansiedele, ohne daß der Baum üppige Überwallungsränder bilde. Wenn aber enge, bis auf das Kambium gehende Frostrisse entstehen und die Nectria finde Eintritt in dieselben, dann antworte der Baum, falls er durch Witterung, Standort, oder Sortencharakter dazu befähigt ist, mit der Bildung von Krebswucherungen. Der Pilzkrebs sei deshalb im wesentlichen von den Frostbeschädigungen abhängig.

Allein, da sind doch wohl die Frostbeschädigungen als Bedingung des Pilzkrebs über Gebühr geschätzt. Denn auch ohne sie kommen an den Zweigen die zahlreichsten und verschiedensten Verletzungen vor. So u. a. besonders durch Knospenzerfetzungen seitens Insekten suchender oder das Knospengrün fressender Vögel, ferner durch Hagelschlag und durch das

---

[1]) Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig 1909. p. 617.

Hervorbrechen der Knospen selbst, sowie durch die Stich- und Fraßwunden der Pflanzenläuse, welche Verletzungen für die keimenden Pilzsporen auf der Rinde überreiche Einlässe zu dem Gewebekörper des Nährwirts abgeben. Es soll also nach Sorauers Anschauung die charakteristische Krebswucherung von äußeren Bedingungen abhängen, insonderheit von der Tiefe der ursprünglichen Verletzung. Eine andere, auch von Küster[1]) vertretene Ansicht läßt die Überwallungswülste beim Krebs (Frostkrebs) dadurch zustande kommen, daß sie entsprechend der größeren Empfindlichkeit ihrer Gewebe alljährlich im Winter unter der Einwirkung der Kälte zugrunde gehen, so daß im folgenden Jahre der geschädigte Baum durch abermalige Umwallung seine Wunde zu heilen sucht.

Falls diese Ansichten zutreffen, dann ist nicht einzusehen, weshalb nicht auch bei anderen Achsenverletzungen wie bei den ganz ungleich tiefen Hagelschlagwunden konzentrische Überwallungswülste auftreten. Hier aber erscheinen sie nicht. Die Rindenwunden verheilen glatt. Die Holzwunden werden je nach der Wundtiefe bis auf eine freie Holzblöße überwallt, aber ohne daß es jemals zu den charakteristischen terrassenförmigen Wulstbildungen käme wie beim Krebs. Die Krebswunde ist mithin eine ganz spezifische Wundbildung, die auf alljährlich sich wiederholende Frostwirkungen nicht zurückgeführt werden kann. Das um so weniger, als sie auch nach milden Wintern mit niedrigen Kältegraden erscheint. Schon R. Goethe macht gegenüber Sorauers Ansicht, daß der Frost die eigentliche Ursache des echten Krebs sei, geltend, der Frost könne wohl krebsähnliche Wunden hervorrufen, niemals aber solche knollige Verdickungen und Anschwellungen des beschädigten Zweigteils, wie sie für die echte Krebswunde charakteristisch sind. Ein Einwurf, den ich nur stützen kann auf Grund der Frostwunden, die ich an den Zweigen des gelben Edelapfels in meinem Garten fand.

Was aber ist nun das bewirkende Agens der eigenartigen Gewebswucherung? Wir können es nach allem nur in der Wachstumsweise des Pilzparasiten erblicken. Er ist es, welcher die Wunde nicht zur Heilung kommen läßt, nicht zu einer Vernarbung, wie sie uns bei anderen Wunden, und zwar recht instruktiv bei den Hagelschlagwunden entgegentritt. Die konzentrischen Wundwülste aber sind der Ausdruck seines aggressiven periodenweisen Wachstums. Sie stehen in Übereinstimmung mit der „ruckweisen" Ausbreitung des Pilzes. Es ist nämlich bezeichnend für das Wachstum des Mycels der Fusariumpilze, hier des F. Willkommii Lind. bzw. der Nectria ditissima Tul., daß es abwechselnd ruht, gleichsam erlischt und dann wieder, wie aufflackernd, üppig neu einsetzt. Davon kann man sich leicht an Kulturen auf dem natürlichen Substrate überzeugen, wie an pilzdurchwachsenen Zweigstücken oder mycelhaltigen Wundkorkstücken. Dies fluktuierende Mycelwachstum erfolgt oft ohne erkennbare Ursache, wennschon gewisse formale Bedingungen, so ein bestimmter Feuchtigkeits- und Temperaturgrad, eine optimale Atmosphäre, auslösend und fördernd wirken. Andererseits stockt plötzlich das Mycelwachstum auch unter diesen günstigen Wachstumsbedingungen.

Was sodann das hypertrophische Wachstum der Überwallungswülste der Krebswunde betrifft, so hängt dies wahrscheinlich mit gewissen Ausscheidungsprodukten enzymatischer Natur des Krebspilzes zusammen. Sie wirken vielleicht als ein besonderer Wachstumsreiz auf das Zellplasma jener Gewebsregionen, die in einer weiteren Umgebung des parasitären Eindringlings liegen, während die benachbarten durch seine Ausscheidungen abgetötet werden, noch ehe sie von seinen Hyphen in Besitz genommen sind. Ein solcher Wachstumsreiz äußert sich alsdann in dem Herbeiströmen eines überreichen plastischen Materials und in einer formativen Tätigkeit, wie wir sie als in etwas Analogem in der auffälligsten Weise in der Gallenbildung wiedersehen. Experimentell ist freilich dieser interessanten Frage schwer beizukommen. Um sie zu entscheiden, müßte man schon das chemische Agens der abnormalen formativen Zelltätigkeit gewinnen, das wir in einem Ferment vermuten. Aber, wie Rosenthal[1]) bemerkt: Wüßte man etwas mehr von der chemischen Konstitution der Enzyme, so könnte man vielleicht daraus Schlüsse auf die besondere Art ihrer Wirkung ziehen.

---

[1]) Pathologische Pflanzenanatomie. Jena 1903. p. 181.

Wenn aber, was schon, wie vorhin bemerkt, Hartig behauptet, die konzentrischen Wülste der Krebswunde das zerstörende Werk des Pilzes sind, so muß er hier allemal anzutreffen sein. Tatsächlich hat denn auch R. Goethe in jeder echten Krebswunde, deren er hunderte untersuchte und ebenso Lapine den Nectria-Pilz in seinen Perithecien, oder in der Konidienform Fusarium Willkommii angetroffen. Bei den 15 von 120 Krebswunden, wo Lapine weder Konidien, noch Perithecien nachwies, ist es nicht ausgeschlossen, daß sich das Mycel des Pilzes in der Wunde dennoch vorfand, worauf diese jedoch, wie erwähnt, nicht näher untersucht waren. Die Krebswunden, die mir vorlagen, enthielten alle das Nectria-Mycel, das freilich bei einer Anzahl oft erst nach einiger Zeit in der feuchten Kammer zutage trat. Wenn andererseits der Nectria-Pilz auch ohne krebsige Wucherungen auftritt, so bliebe noch zu untersuchen, wie sich weiterhin das Verhalten der befallenen Geweberegion zeigt, ob nicht nach kürzerer oder längerer Zeit, entsprechend dem fortschreitenden Eindringen des Parasiten in den Rinden- und Holzkörper, an der heimgesuchten Achsenorganpartie dennoch echte Krebswülste entstehen. Daß die konzentrische Wulstbildung mit der Art der ursprünglichen Achsenorganverletzung durch Frost zusammenhinge, ob rindenflach oder kambiumtief, das erscheint mir ziemlich unwahrscheinlich. Denn wie die Infektionsversuche von Lapine lehrten, kommt es auch zur Bildung einer echten Krebswunde, wenn überhanpt keine sichtbaren Verletzungen bei der Ansiedelung der Nectria voraufgegangen sind. Und Goethe spricht bei seinen Impfungen von seichten, mit Konidien besäten Rindeneinschnitten, wonach die charakteristischen Krebswunden entstanden seien.

Handelte es sich bei den bisherigen Untersuchungen über den Obstbaumkrebs um die Ausfindigmachung der Krankheitsursache, so beschäftigt sich eine Arbeit von E. Münch[2]) mit der Frage der Immunität gegen den Krebs und mit der Krankheitsempfänglichkeit. Nach v. Tubeuf und Münch verhindert der Luftmangel in den Geweben das Eindringen des Pilzes in den Gewebekörper. Wie Münch auf Grund seiner experimentellen Ergebnisse mit Pilzinfektionen an Laubholzzweigen erklärt, so ist der herrschenden Anschauung, daß die lebenden Zellen dem eindringenden Pilze einen aktiven Widerstand entgegensetzen, durch Antifermente oder durch Bildung von Schutzgeweben oder auf irgendeine andere Weise, so ist dieser

---

[1]) Die Enzyme und ihre Wirkung. (Biolog. Centralbl. 1911. p. 187.)

[2]) Untersuchungen über die Immunität und Krankheitsempfänglichkeit der Holzpflanzen. Dissert. Ludwigsburg 1909.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Anschauung der Boden entzogen dadurch, daß sich abgetötete Holzstücke bei hohem Wassergehalte genau so immun gegen Pilzangriffe und bei hohem Luftgehalt genau so empfänglich wie lebende Stücke erwiesen. Dieses experimentelle Resultat spricht Münch als ein Gesetz an. Und jenes Gesetz der Abhängigkeit der Immunität und Empfänglichkeit vom Luftgehalt gelte auch für bewurzelte und belaubte Sprosse im Vegetationszustande. Dabei bemerkt jedoch Münch, daß bei einem mit Nectria cinnabarina geimpften, im Wasser stehenden Sproßstück die Rinde auf 12 cm abgetötet war, das Holz dagegen nur auf 2½ cm! Auch ein auf seinem natürlichen Wassergehalt belassenes Stück zeigte die Erscheinung. Und in bezug auf Nectria ditissima heißt es: „Nicht vollkommen immun erwiesen sich dagegen einjährige Zweige von Ulmus montanus, auch wenn sie im Wasser standen und möglichst vor Wasserverlust geschützt waren. Sie ließen sich sogar leicht ohne jede Verletzung durch bloßes Bestreichen der Rinde mit Sporen infizieren.“

Also Ausnahmefälle! Dann ist freilich das von Münch aus seinen Versuchen über die Immunität und Empfänglichkeit von Holzpflanzen abgeleitete allgemeine Ergebnis hinsichtlich des Verhaltens der schmarotzenden Pilze gegenüber einem wasserreichen und daher luftärmeren und gegenüber einem wasserarmen und deshalb luftreicheren Gewebekörper kein Gesetz, sondern höchstens eine Regel! Denn nur die Regel erleidet Ausnahmen, nicht aber das Gesetz. Daß von Hartig mit Nectria ditissima vorgenommene Infektionsversuche im Mai erfolglos, im September erfolgreich ausfielen, bringt Münch mit seinem „Gesetz“ in Einklang, indem die Rinde während der Vegetation, namentlich im Beginn wasserreicher und luftärmer, als im übrigen Jahre, also immun sei.

Allein, damit stimmen die Infektionsversuche von Goethe und Lapine an Obstbäumen nicht überein. Sie wurden im April, Juni und Juli vorgenommen und fielen sämtlich erfolgreich aus. Das verstößt also vollständig gegen das angebliche Gesetz der Immunität! Den Ausnahmefall, daß die mit Nectria cinnabarina geimpfte Rinde auch der wasserreichsten Sprosse nur eine geringe Immunität bewies, das glaubt Münch damit zu erklären, daß es in der Rinde an den osmotisch wirksamen Stoffen gemangelt habe, die notwendig seien, um den Turgor der Rindenzellen aufrecht zu erhalten. — In diesem Gedankengange vermag ich Münch nicht zu folgen. Denn daß es den Rindenzellen eines im Wasser stehenden Zweigstückes an osmotisch wirksamen Stoffen für den Turgordruck gefehlt habe, also gleichsam ein Gleichgewichtszustand zwischen dem glatt durch Zellmembran-Protoplasma diffundierenden umgebenden Wasser und dem Zellsaft als mehr oder weniger konzentrierter Substanzlösung bestände: das ist denn doch wohl nicht gut anzunehmen. Gewißheit hierüber hätten übrigens nur plasmolytische Untersuchungen ergeben. Soviel ist jedenfalls sicher: aus den mit verschiedenen Pilzen, so auch mit Nectria ditissima und N. cinnabarina von Münch angestellten Infektionsversuchen in Rücksicht auf Immunität und Empfänglichkeit läßt sich kein allgemeines Gesetz ableiten. Ob eine Regel? Auch das erscheint nicht ohne weiteres fraglos, wie wir hernach sehen werden.

Schließlich sei in unserem historischen Rückblick noch einer Untersuchung Josef Weeses[1]) gedacht, die sich mit dem Parasitismus der

---

[1]) Zur Kenntnis des Erregers der Krebskrankheit an den Obst- und Laubholzbäumen. (Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Österr. 1911. p. 872.)

Nectria ditissima befaßt und zu dem Resultat kommt, daß nicht die N. ditissima Tul., sondern die N. galligena Bres. die Krebskrankheiten am Obstbaum hervorrufe. Wie denn diese beiden Nectria-Arten recht häufig mit einander verwechselt seien. In einer späteren Arbeit[1]) bemerkt Weese ebenfalls, daß nicht die N. ditissima Tul. = Nectria coccinea (Pers.) Fries, wie bisher nach Rob. Hartig, Rud. Goethe und Aderhold behauptet wurde und in allen pflanzenpathologischen Werken zu lesen sei, die Ursache der Krebsbildungen an den Obst- und Laubholzbäumen wäre, sondern eine von diesem Pilze deutlich verschiedene Nectria-Art, die N. galligena Bresad. Nach unserem Autor kann N. galligena bloß Krebsstellen verursachen, während N. coccinea = N. ditissima nur aus der Rinde hervorbricht und keinerlei krebsartige Wunde nach sich ziehe. Und wie Weese weiter meint[2]), sei es sehr wahrscheinlich, daß N. galligena Bresad. zu einem der vier von Appel und Wollenweber unterschiedenen Stämme von Fusarium Willkommii Lindau gehöre. Er hebt ferner mit Recht hervor, daß, solange die beiden Nectria-Arten verwechselt und nicht scharf auseinander gehalten würden, werde die Konfusion nicht schwinden und die Widersprüche in der Literatur, wie sie jetzt bezüglich des Parasitismus und bezüglich der Struktur von N. ditissima bei hervorragenden Pflanzenpathologen und Mykologen fänden, würden nicht aufhören.

Welche Art nun R. Goethe und Lapine bei ihren Untersuchungen vor sich gehabt haben, das geht aus ihrer Darstellung nicht sicher hervor. Nach Goethes[3]) Angaben stimmte sein Pilz noch am meisten mit N. ditissima Tul. überein. Meinen nachfolgenden Untersuchungen lag Nectria ditissima Tul. zugrunde. Und es sei hier schon gegenüber der obigen Behauptung Weeses erklärt, daß Nectria ditissima im vollen Umfange echte Krebswunden erzeugt und daß ferner Fusarium Willkommii Lindau nicht, wie Weese vermutet, die Konidienform von N. galligena Bres. ist, sondern von N. ditissima Tul. Das Vorkommen dieser Nectria-Art scheint in meiner Gegend vorzuherrschen gegenüber der N. galligena, die ich bisher nicht gefunden habe. Es ist nun nicht unmöglich, daß wir es hier mit vikarierenden Spezies zu tun haben. Wie denn die geographische Verbreitung der Fusarium-Arten überhaupt Eigenartiges aufweist[4]). So traf ich bislang auch an Weizen nicht das weitverbreitete Fusarium nivale Sor., den sogenannten Schneeschimmel an; wohl aber den nahen Verwandten Fusarium rubiginosum Appel und Wollenweber. Auch Schaffnit[5]) berichtet, daß er an dem Ernteprodukt von einem größeren Gute in Posen wiederholt nur als einzige Art Fusarium rubiginosum feststellte, während F. nivale dort völlig fehlte.

---

[1]) Studien über Nectriaceen. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 1. 1912. p. 132.)

[2]) Zusammenhang von Fusarium nivale mit Nectria graminicola Bertr. et Br. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 2. 1913. p. 300.)

[3]) Landw. Jahrb. 1880. p. 840.

[4]) Vgl. auch: O. Appel und H. W. Wollenweber, Grundlagen einer Monographie der Gattung Fusarium. (Arb. a. d. Biolog. Anst. f. Land- u. Forstwirtsch. Bd. 8. 1910.)

[5]) Der Schneeschimmel und die übrigen durch Fusarium nivale Ces. hervorgerufenen Krankheitserscheinungen des Getreides. (Landwirtsch. Jahrb. Bd. 43. 1912.)

II.

Der Obstbaumkrebs der Nectria ditissima Tul.

Die Krebswunde.

Die äußere Krebswunde ist sattsam beschrieben; weniger aber ist die innere nach ihrem pathologisch-anatomischen Verhalten bekannt. Die Krebswunde, die uns hier zunächst beschäftigen soll, stammt von einem fünfjährigen Apfelzweig der Blenheims Renette. Sie hatte dessen halben Zweigumfang umfaßt. Die Länge der Wunde von Wulstrand zu Wulstrand betrug 30 mm, die Breite 27 mm. An der krebsigen Zweighälfte des Achsenorgans besaß der hypertrophierte Rindenkörper 3 mm oberhalb der Krebswunde noch eine Dicke von 3,5 mm. Nach der gesunden Zweighälfte hin nahm, wie das an Querschnitten durch den betreffenden Achsenorganteil hervortrat, diese Rindendicke allmählich ab. Und gegenüber jener größten Rindendicke auf der Wundseite hatte der Rindenkörper auf der gesunden Zweigseite nur 1 mm Dicke. Gewiß ein auffälliger Gegensatz! Erst über eine Entfernung von 17 mm oberhalb der Wunde fand in der Mächtigkeit des Rindenkörpers ein Ausgleich statt, so daß er hier in seinem ganzen Umfange die gleiche Dicke aufwies. Die Rindenoberfläche an der Krebswunde war rissig, während sie sonst ein glattes Aussehen besaß. Weiter ergaben die Querschnitte durch das Achsenorgan, daß 3 mm oberhalb der Krebswunde der Holzkörper auf der Wundseite noch eine Ausdehnung von 7 mm bis zur Rinde hatte, gerechnet vom Markzentrum aus, dahingegen auf der gesunden Zweigseite nur 5 mm. Und 17 mm oberhalb des Wundrandes besaß der Holzkörper auf der Wundseite 6 mm Dicke, auf der gegenüberliegenden gesunden Zweigseite 5 mm. In diesen vergleichenden Zahlenangaben spiegelt sich das hypertrophische Wachstum des krebsigen Gewebekörpers des Achsenorgans wieder.

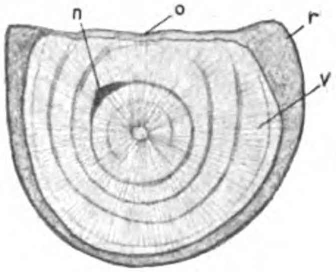


Fig. 1.

Wie der Rindenkörper der Krebswunde, so zeigt auch der vom Rindendruck befreite Holzkörper eine Ausweitung. Nach der Wundfläche, also nach der freigelegten Holzblöße hin, sind die Jahresringe auseinandergespreizt. (Fig. 1.) Und bei unserem fünfjährigen Achsenorgane erscheinen auf dem Querschnitt innerhalb des dritten und vierten Jahresringes breite Parenchymholzbänder, die gleichsam wie Keile sich in das Holzgewebe schieben. Auf diese Erscheinung hat auch schon Sorauer[1]) bei dem geschlossenen Krebs aufmerksam gemacht, während nach ihm „die charakteristische Fächerung bzw. Spaltung eines Jahresringes innerhalb der holzparenchymatischen Wucherränder" bei dem offenen Krebs minder deutlich sei.

An der Grenze des zweiten Jahresringes zeigte unsere Krebswunde sodann einen fast 2 mm langen und ½ mm breiten, in der Mitte mit dreieckigem Zipfel rindenwärts laufenden, tiefbraun berandeten Spalt (Fig. 1a). Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieser, auf der Grenze des Herbstholzes zum Frühjahrsholz liegende Spalt ein Frostriß ist. Im Bereiche des unteren, markwärts gekehrten Spaltrandes waren die Gefäße mit Wundgummi erfüllt. Die Markstrahlzellen und Holzparenchymzellen der unteren Randzone hatten einen braunkörnigen Inhalt. Das Lumen des Spaltes war mit den abgelösten, abgestorbenen Gewebsmassen gefüllt (Fig. 2a). Oberhalb des Spaltes bestand die Gewebszone gleichmäßig aus radiär angeordneten Parenchymholzzellen. Dies Gewebe steigt zu beiden Seiten des dreieckigen Spalts schräg und strahlenartig gegen die Mittellinie des Achsenorgans rindenwärts auf (Fig. 2v). Schließlich geht es in das normale Holzgewebe über. Die beiden Ecken des dreieckigen Spalts laufen seitlich in unregelmäßige, gelbe Rißlinien mit kurzen, feinen Seitenästen aus. Und wo diese feinen Rißlinien verlaufen, da erscheint in der Gewebsregion eine Störung, die, so geringfügig und eng begrenzt sie auch sein mag, dennoch sich von dem benachbarten normalen Holzgewebe abhebt. Und zwar treten hier bis zum Verschwinden die Fasertracheiden und die trachealen Gewebselemente zurück. Dahingegen sind die Markstrahlzellen und die Holzparenchymzellen, also die lebenden Zellelemente des Xylem, größer und abweichend von den normalen gestaltet.

---

[1]) A. a. O. p. 587.

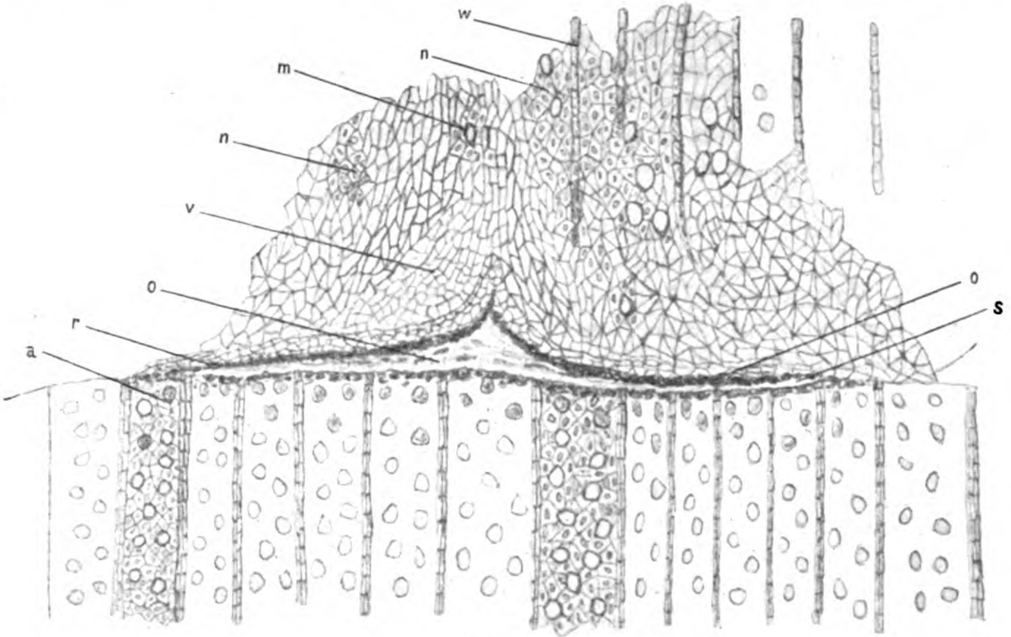


Fig. 2.

Die Abweichung erstreckt sich in dem Gebiete der letzten Ausläufer der Risse auf wenige Zellreihen, die als intermediäres Gewebe sich zwischen das normale Xylem schieben. In dem Parenchymholzgewebsgebiete nehmen die Markstrahlzellen vielfach den histologischen Charakter der Parenchymholzzellen insofern an, als ihre langgestreckte, tafelförmige Gestalt in eine mehr viereckige übergeht und die Zellwände sich stärker verdicken. Am oberen Spaltenrande sind die Grenzzellen des Parenchymholzgewebes verkorkt.

An der Krebswunde des Holzkörpers kann man nun zwei Regionen unterscheiden: a) eine tote, braungefärbte Region mit abnormalen Gewebselementen und b) eine lebende Region mit abnormal gebauten oder gestörten Gewebselementen. Die letztere geht in das normale Xylem über. Die beiden Wundregionen erstrecken sich je ungleich tief gegen den zentralen Teil des Achsenorgans. Ihre Grenzlinien verlaufen buchtenförmig. Was beide charakterisiert und was beide gemeinsam haben, das ist der abweichende Bau und die Verwerfung ihrer Holzelemente, sowie das abnormale Verhalten der Markstrahlen. Die tote Region der Krebswunde des Holzkörpers wiederum besteht aus einer äußeren und aus einer inneren Zone. Die äußere bildet die Wundoberfläche des bloßgelegten Holzkörpers. Sie besteht aus einer braunschwarzen, krümeligen und zerknüllten Masse der abgestorbenen Gewebspartien, in welcher das Mycel des Krebspilzes wuchert. Von der Oberfläche gehen ungleich tiefe, radiale Risse nach einwärts. Ebenso treten tangential verlaufende Risse auf, so daß diese äußere Wundzone zerklüftet ist. Die Rißspalten sind vom Mycel durchsetzt. Wie R. Goethe bereits angab, bevorzugen die Hyphen bei ihrer Ausbreitung die Markstrahlzellen. In den tieferen Lagen dieser äußeren Krebswundzone tauchen sie in den Gefäßen auf. Ebenso sieht man sie in den Markzellen, wo sie gewöhnlich durch die Tüpfel ihren Weg von Zelle zu Zelle nehmen.

Das an die Außenwelt stoßende Krebswundgewebe mit der Mycelschicht der äußeren Zone unseres Querschnittes, dessen Struktur stellenweise kaum noch zu erkennen war infolge des Zerfalls, bestand in dem betreffenden Präparat gleichmäßig aus Parenchymholz. Die zerknitterten, vielfach aus dem Verbande gelösten schalenartigen Zellen waren leer, oder mit einer braunkörnigen, größtenteils wohl aus zerfallenen Stärkekörnern bestehenden Masse gefüllt. Auch große Kalkoxalatkristalle kamen in den Zellen vor. Zwei- bis vier- und mehrreihige Markstrahlen durchsetzten das Holzgewebe. Gefäße erschienen in der äußeren Zone ganz ungleichmäßig; zum Teil waren sie mit Wundgummi gefüllt. Weiter weg von der freien Wundoberfläche ging das Parenchymholz in partienweise auftretendes sog. Wimmerholz über. Hier waren starke Verlagerungen der Holzzellelemente vorgekommen. Die Fasertracheiden der Felder zwischen den Markstrahlen waren tangential gestreckt, oft ganz schräg verlaufend. Diese Verlagerung verlor sich dann allmählich in den Nachbarfeldern der betreffenden Gewebspartien, wo die Fasertracheiden im Querschnitt den normalen polyedrischen Bau aufweisen. Wie denn hier auch die übrigen Gewebselemente des Holzkörpers, Tracheen, Tracheiden und Holzparenchymzellen neben den Markstrahlzellen ein normales Verhalten zeigten, wie wir es von dem Holzgewebe von Malus communis kennen. In den verlagerten Holzgewebspartien kamen Gefäße nur spärlich vor, außerdem vereinzelte Parenchymholzzellen. Mit diesen Wimmerholzbreiten wechselten Querbänder aus Parenchymholzzellen ab. So zwar, daß auf unserem Querschnitt durch den Holzkörper der Krebswunde des Achsenorgans von der Wundoberfläche nach dem zentralen Achsenorganteile aufeinander folgten: Mycelhaltige und spaltenreiche Parenchymholzpartie, dann eine Breite verlagerter Holzgewebselemente, hiernach ein schmales Parenchymholzzellenband, dahinter eine Wimmerholzbreite, dann wieder ein schmales, aus 5—7 Zellreihen bestehendes Parenchymholzband, dem sich eine etwas breitere Region verlagerter Fasertracheiden anschließt, die zu einem vierten Parenchymholzzellenbande von etwa gleicher Breite wie das vorige hinüberführt und endlich hierauf eine verlagerte Holzfaserpartie, die zum normalen Holzgewebe überleitet. Selbstverständlich zeigt die Krebswunde des Holzkörpers des Achsenorgans nicht überall dieses histologische Verhalten. Aber darin stimmen die anatomischen Unregelmäßigkeiten und Strukturabänderungen in der krebsigen Hälfte des Holzkörpers des Achsenorgans überein, daß in der äußeren Wundzone das in radiären Reihen angeordnete Parenchymholz überwiegt, das tracheale Element dort nur spärlich erscheint, die tangential gestreckten und oft mächtig entwickelten, sowie die normal ausgebildeten Fasertracheiden nesterweise auftreten oder weiterhin erstere in breiten Bändern und ferner, daß die

Markstrahlen stark verbreitert sind. Verfolgt man sie von der zentralen Achsenpartie aus dem normalen Xylem nach der Wundoberfläche zu, so erkennt man auf dem Querschnitt, wie sie sich streckenweise bauchig verbreitern, um dann wieder schmäler zu werden. Und zwar erfolgt diese Verbreiterung vornehmlich, wenn sie aus der wimmerigen Holzgewebszone in das Parenchymholzzellenband treten.

Die Überwallungswülste der Krebswunde.

Wie sich das histologische Querschnittsbild durch die Krebswunde des bloßgelegten Holzkörpers eines Apfelbaumzweiges ausnimmt, das ist vorhin beschrieben. Gehen wir nun von dieser zentralen Wundpartie zu den lateralen Wulstpartien der Krebswunde über, so haben wir es hier mit einem Rinden- und einem Holzkörper zu tun. Das anatomische Verhalten der abgestorbenen wie der regenerierten Gewebemassen lehren uns wieder Quer- und Längsschnitte durch die Krebswunde. Eine dunkelbraune, verwitterte, zerrissene und krümelige abgestorbene Rindenmasse, die zumal in den Lücken vom Pilzmycel durchsetzt ist, bildet die Oberfläche der Überwallungswülste der Krebswunde. In dieser bröckeligen toten Gewebsmasse treten die Bastbündel deutlich hervor, wenn sonst auch die Gewebestruktur kaum noch zu unterscheiden ist. Jene Rindengewebselemente lassen erkennen, wie weit gegen das Innere die Rinde abstarb. Daß wir es sodann in der Pilzbesiedelung dieser Massen mit dem Nectria-Mycel zu tun haben, ergibt sich aus den Konidien.

Das abgestorbene Rindengewebe ist von dem lebenden durch ein mehrschichtiges Wundkorkgewebe getrennt, das aus den Rindenparenchymzellen durch tangentiale Teilung und Meristembildung hervorging. Ein nach Verwundungen des Rindenkörpers auftretender und schon oft beschriebener Regenerationsvorgang! Streckenweise war es in dem Rindenwulste der Krebswunde indes nicht zur Bildung eines Wundperiderms gekommen. Das abgestorbene Rindengewebe griff mit unregelmäßigen Ausstrahlungen in das lebende über. Stellenweise gingen diese abgestorbenen Gewebestreifen in das Parenchymholzgewebe über, welches an das Rindengewebe anschloß. Das abgestorbene Gewebe hatte eine tiefbraune Färbung, die heller wurde nach den lebenden Gewebepartien hin, entsprechend dem Maße, wie das Absterben der Gewebe fortgeschritten war.

Die Gewebedifferenzierung des Rindenkörpers der konzentrischen Überwallungswülste der Krebswunde, die in ihrem fortschreitenden Wachstum durch die periodenweise Abtötung von Gewebspartien gehemmt wurden, ist ungleich bewirkt. So besteht das Rindengewebe unterhalb des Wundperiderms, welches das abgestorbene Gewebe von dem lebenden trennte, aus einem gleichmäßigen großzelligen Parenchymgewebe. Ein Kollenchymgürtel ist noch nicht ausgebildet. Die Bastfaserbündelregion, die im normalen Rindenkörper auf dem Querschnitt aus 4—5 übereinander gelegenen Gürteln besteht, erschien in Gestalt einzelner Bastfaserbündel, die in das Rindengewebe eingesprengt waren. Ebenso war, wie tangentiale Längsschnitte durch den Überwallungswulst auswiesen, der Siebröhrenapparat nur unvollständig ausgebildet. Während er im normalen sekundären Rindenparenchymgewebe ein scharf hervortretendes, parallel mit den Bastbündeln geschlängelt verlaufendes und zusammenhängendes gegliedertes Röhrensystem mit Geleit- und Libriformzellen vorstellt, erkennt man in dem Phloemteil des Wundgewebes zwischen den massigen Rindenparenchymzellen nur verhältnismäßig spärliche, gedrungen gestaltete Siebröhrenelemente und ohne einen solchen übersichtlichen Zusammenhang wie in dem normalen Gewebekörper. Auffällig war jedoch die große Tüpfelung der Siebröhrenzellen und die Größe der Geleitzellen. Eine gewisse korrelative Beziehung bestand zwischen dem Siebröhrenapparat und dem Bastbündelring insofern, als, wo dieser unausgebildet auftrat, auch jener das gleiche Verhalten zeigte.

Die Zellen der Rindenmarkstrahlen sodann, die vom Kambium gegen den Wundrand aufsteigen, nahmen alsbald den Charakter der runden Rindenparenchymzellen an. Sie waren von diesen nicht mehr zu unterscheiden. In anderen Fällen wieder traten die Rindenmarkstrahlen in ihrem ganzen Verlaufe deutlich hervor. Die primären gingen bis in die Nähe des Wundperiderms, wo sie an eine mehrreihige Schicht radiär angeordneter, viereckiger, an den Ecken abgerundeter Rindenparenchymzellen stießen.

Was an dem Rindenkörper der Krebswundwülste aber vor allem auffällt, das ist deren Mächtigkeit. Es ist die hypertrophische Ausbildung des Rindenparenchyms. In einem solchen Rindenkörper trifft man andererseits auch wohl die Bastbündelregion ebenfalls mächtig entwickelt. So erschien sie in einem Querschnitt in fünf übereinander gelegenen kräftigen Bündelreihen. Sie zeigten zum Teil eine Verlagerung, so daß sie im Querschnitt längsgestreckt erschienen. Es ist das bei den Bastbündeln im Rindenkörper die gleiche Erscheinung wie bei den mechanischen Gewebeelementen, den Fasertracheiden, im Holzkörper des Wundgewebes. Wie denn überhaupt dessen Rindengewebe oft partienweise in der Anordnung der Zellelemente gegenüber dem normalen Verhalten wie verzerrt erscheint. Die Markstrahlen nehmen einen stark geschlängelten Verlauf an. Die Rindenparenchymzellen der Zwischenfelder zwischen den Markstrahlen sind teilweise zusammengedrückt mit verbogenen Zellwänden. Das hypertrophierte Rindengewebe besaß klaffende Interzellularen, die gewöhnlich mit großen Kalkoxalatkristallen angefüllt waren. Der Querschnitt durch die Krebswunde an einem dreijährigen Zweige zeigte sodann, wie die Markstrahlen in der kambialen Region, sowie sie aus dem Holzkörper in den Rindenkörper traten, unter einem Winkel von etwa 45° seitlich umbogen. Unterhalb des abgestorbenen Rindengewebes der Krebswunde hatte sich ein Wundperiderm gebildet, das seitlich in das unverletzte überging. Insofern war zwischen den beiden benachbarten Rindenregionen eine Grenze zu erkennen, und ein Unterschied, als an das alte Periderm ein Kollenchym anschloß, das unter dem seitlich anschließenden regenerierten Periderm noch nicht differenziert war. An dessen Stelle trat eine aus radiär angeordneten viereckigen Parenchymzellen bestehende Gewebezone.

Auf unserem Querschnitt waren im Holzkörper zwischen den Markstrahlen sodann Verlagerungen zu erkennen. Neben stärkekörnchenreichen, dickwandigen, runden oder polyedrischen Parenchymholzzellen und tangential gestreckten Fasertracheiden traten dickwandige große Gefäße mit zahlreichen Hoftüpfeln mit Längsspalt auf. Stellenweise herrschte das tracheale Gewebselement derartig vor, daß drei solcher Gefäße nebeneinander lagen und die ganze Breite des Holzgewebestreifens zwischen den Markstrahlen einnahmen. Man trifft in dem Holzkörper der Überwallungswülste der Krebswunde sogar Holzgewebspartien, wo das mechanische Zellelement in Gestalt vereinzelter Fasertracheiden neben den Parenchymholzzellen erscheint, um plötzlich an anderer Stelle zu verschwinden und sieben im Querschnitt länglich erscheinenden, parallel neben einander gelagerten, großen Gefäßen Platz zu machen. Sie geben an der Stelle ihres Vorkommens den Übergang zu einem gleichmäßigen Parenchymholzgewebe ab, worin hier auch die Markstrahlen unterschiedslos aufgehen, um weiter rindenwärts wieder mit verbreiterter Basis daraus hervorzutreten. Gleichzeitig stellen sich als eine weitere Differenzierung in jener Region auch die Fasertracheiden wieder ein; allerdings in tangential gestreckter Verlagerung. Die nur durch ihre Wände voneinander getrennten sieben Gefäße hatten eine reiche Tüpfelung.

Die Entstehung der Krebswunde.

Über die Entstehung der Krebswunde geben uns deren erste Stadien an einem jugendlichen Achsenorgan einigen Aufschluß. Wenn gerade nicht häufig, so findet man doch immerhin solche Objekte. So hatte ich eine Anzahl einjähriger Apfelzweigtriebe der Blenheims Renette im Februar in ein feucht gehaltenes, verkorktes Zylinderglas bei Zimmertemperatur gestellt. An zweien dieser abgeschnittenen vorjährigen Zweige, deren Knospen in der feuchten, warmen Atmosphäre des Glases austrieben, zeigten sich unerwartet nach 8—10 Tagen an mehreren Knospen weiße Mycelbäuschchen wie Watteflaum. Untersucht, stellte sich heraus, daß sie drei verschiedenen Fusarienpilzen angehörten, die miteinander vergesellschaftet auftraten. Wenigstens fand ich zwei Formen an ein und derselben Knospe.

Und wie stand es nun mit der Zweigwunde an der verpilzten Knospe? Das Rindengewebe unterhalb der Knospe und des Blattstielhöckers war in der Ausdehnung von etwa einem Zentimeter eingesunken und von blasiger, pustelartiger Oberflächenbildung. Die Umgebung der Knospe hatte genau das brandige Aussehen der ersten Stadien der Krebswunde, die nach einer mehrmonatlichen Inkubationszeit aus einer Impfwunde hervorgegangen war, welche ich einem zweijährigen Zweige des Wintercalvill-Apfels beigebracht und mit den Askosporen der Nectria ditissima beschickt hatte.

An Schnitten durch die brandige Stelle des von den Fusarienpilzen befallenen Achsenorgans und durch das Kissen des Blattstiels unterhalb der Knospe, sowie durch diese selbst ließen sich nun die Absterbeerscheinungen an den verschiedenen Geweben verfolgen, wie sie sich in den Gewebsbräunungen kund tun. So zeigten mehrere Querschnitte, wie das Periderm über eine Strecke hinaus gesprengt und das primäre und sekundäre Rindenparenchym partienweise bis zum Kambium und darüber hinaus, sowie ein Teil der Markstrahlzellen und Holzparenchymzellen des Holzkörpers gebräunt waren, während die Gefäße der letzteren Gewebspartien sich mit Wundgummi gefüllt hatten. In den stark gebräunten abgestorbenen Rindenparenchymgewebspartien war der Zellverband gelockert, so daß ungleich große Interzellularen entstanden. Das Parenchymgewebe war von dem feinen Fusariummycel durchwuchert. Die Hyphen durchzogen inter- und intrazellulär, vorzugsweise interzellulär das Zellgewebe. Und von den abgestorbenen, gebräunten, strahlenförmigen Partien des Rindenparenchymgewebes drangen die Hyphen gegen das gesunde, ungebräunte vor. Und weiterhin traten sie in den Holzkörper ein, wo sie besonders in den Gefäßen auftauchten. Was jedoch vor allem auffiel, das war der Umstand, daß sich, wie das sonst bei Verwundungen in der Regel der Fall, keinerlei Wundperiderm gebildet hatte. Nur stellenweise war es zu einer Meristemzonenbildung gekommen. Wie nun aber die Ansiedelung der Fusarienpilze an den befallenen Knospen des einjährigen Achsenorgans vor sich gegangen, das entzieht sich der Einsicht. Daß der eine oder der andere der Pilzparasiten aktiv seinen unverletzten Nährwirt angegriffen, indem die Keimschläuche der Sporen das Periderm durchbohrten: diese Anschauung findet in den Infektionsversuchen mit Fusariensporen keine Stütze. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß eine der zahlreichen äußeren Gewebsschädigungen vorliegt, wie sie am leichtesten und ehesten gerade in dem lockeren Gewebekörper der Umgebung der Knospe auftreten und meist durch Gewebsrupturen infolge der aus dem Achsenorgan hervorbrechenden Knospen oder durch Frostwirkungen verursacht werden. Auf solche Weise entstanden gewiß Eingangspforten in den Gewebekörper für die Keimschläuche der zugeführten und an den Vorsprüngen der Knospen haften gebliebenen Sporen. Und da ist es denn interessant, daß nicht nur Nectria ditissima bzw. deren Konidienform, sondern auch noch zwei andere Fusarienarten hier erscheinen. Es liegt mir ferner ein Präparat vor von einem einjährigen Apfelzweigtriebe mit einer brandigen Wunde, worin neben dem Fusarium in unmittelbarer Nachbarschaft die mächtigen Fruchtlager des Fusicladium dendriticum vorkommen. Zwei ganz verschiedene Pilzparasiten also in ein und derselben Zweigwunde![1])

Aus unseren Befunden läßt sich nun folgern, daß eine Infektion der einjährigen krebsigen Apfelzweige schon zu einer Zeit vor sich gegangen sein kann, als sich noch gar kein Periderm gebildet hatte, also die Besiedelung der Pilze um so leichter war. Daß die Wunden mit den Fusarienpilzlagern wie eingesunkene Brandplatten aussehen ohne die charakteristischen Wülste der eigentlichen Krebswunde, das ist insoweit erklärlich, als das Gewebematerial des einjährigen Achsenorgans so gering ist, daß es alsbald größtenteils abstirbt und es zu wulstartigen Neubildungen, die ihrerseits wieder absterben, um neuen Gewebsbildungen Platz zu machen, in der Regel nicht kommt. Aber da in diesen brandigen, von Pilzparasiten bewohnten Wunden sich deren Zerstörungswerk schrittweise verfolgen läßt von den abgestorbenen Gewebepartien zu den gesunden, so dürfen wir wohl mit Recht hier von Krebswunden sprechen und ihre Entstehung direkt auf die Fusarienpilze zurückführen.

Die parasitären Pilze der Krebswunde.

Als der eigentliche Krebspilz des Obstbaumkrebs gilt Nectria ditissima Tul. Wenn demgegenüber Weese, wie früher erwähnt, nun behauptet, daß N. ditissima = N. coccinea (Pers.) Fr. den Krebs nie an Obstbäumen hervorrufe, sondern nur N. galligena Bres., so trifft das nicht zu. Ich habe in den zahlreichen Krebswunden, die ich untersuchte, nur N. ditissima gefunden; N. galligena konnte ich bislang nicht nachweisen. Nach der Beschreibung, die Weese von N. galligena gibt, sollen bei dieser die Perithecien nicht zusammenfallend sein. Bei unserer Form waren sie indes zusammenfallend. N. galligena hat nach Weese einen 190μ breiten, lebhaft glänzenden, dunkleren, meist fast schwarzen, deutlich radialfaserigen Mündungskegel oder ebenso breite, mehr oder weniger scharf abgegrenzte Scheibe mit deutlichem Ostiolum. Unser Krebspilz war ausgesprochen eiförmig bis zitronenförmig ohne besonderen Mündungskegel oder Scheibe. Irgendwelche unterschiedliche Regionen traten an dem eiförmigen Körper des Peritheciums überhaupt nicht hervor, weder in der äußeren Form, noch in der Farbe, noch in der Struktur. Die Mündungsöffnung der Fruchtkapsel ist terminal und durchbricht die Perithecienwandung, ohne sich weiter abzusetzen. Sie stellt einen länglichen oder elliptischen Porus dar, der in einer grubigen Vertiefung des Peritheciumscheitels liegt. Das Mündungs- oder Polfeld zeigt eine rundzellige Felderung. Und dementsprechend bildet der Rand des Porus eine unregelmäßig verlaufende, wellenförmige Linie als Ellipse. Die Öffnung ist etwa 21 μ lang und 10—14 μ breit. Die runden Zellen des Polfeldes, die auch den Rand des Porus umsäumen, sind etwa 2 μ im Durchmesser. Die Perithecienwandung, im oberen und unteren Gehäuseteile dicker, als im mittleren, besteht, wie Querschnitte und Längsschnitte durch die Fruchtkapsel ausweisen, aus zwei ungleichen Wandschichten, einer äußeren und einer inneren. Die äußere und mächtigere Schicht ist rotfarbig, die innere, dünnere, blaß. Die äußere besteht aus 5—7 Reihen dick- und derbwandiger, polyedrischer Zellen, die innere aus 4 bis 5 Reihen blasser, etwas kleinerer und mehr gestreckter, dünnwandigerer Zellen, so daß die äußere Wandschicht mehr aus einem paraplektenchymatischen, die innere mehr aus einem prosoplektenchymatischen Gewebe zusammengesetzt erscheint. Indes ist dieser Unterschied nicht durchgreifend. Während jedoch die Perithecien der N. galligena nur „im basalen Teile deutlich parenchymatischen Aufbau zeigen" sollen, ist das bei N. ditissima durchweg der Fall. Die Größe der Zellen ist freilich sehr ungleich, 8 μ lange und 4 μ breite Zellen trifft man meist an. In der Scheitelregion der Fruchtkapsel sind sie bedeutend kleiner.

---

[1]) Es ist höchst wahrscheinlich, daß hier das Fusicladium als erster am Platze war und das Fusarium sich hinterher als Wundparasit einfand. Wenn schon nicht ausgeschlossen ist, daß das Umgekehrte auch der Fall sein könnte und das Fusarium durch irgendeine Rindenverletzung Eingang gefunden hätte, ehe diese durch die einsetzende Wundkorkbildung verschlossen ward. Aber die erstere Annahme hat mehr für sich, da sie durch eine Beobachtung gestützt wird, die ich an dem Fruchtstiel einer jungen Apfelfrucht im Juni machte. Hier fand ich nämlich ein wohlausgebildetes Konidienlager des Fusicladium dendriticum unter der gesprengten und abgehobenen Kutikula und auf der Epidermisschicht des Rindenkörpers des Apfelfruchtstiels. Ein Periderm war noch nicht ausgebildet. Der Anfang dazu war erst insofern gemacht, als die eine und andere Epidermiszelle sich durch eine tangentiale Wand geteilt hatte. Aber noch ehe es in der Epidermisschicht zur Phellogen- und Korkbildung gekommen war, hatten schon Rindenparenchymzellen unterhalb des Fusikladiumstromas durch tangentiale Teilungen Meristemzellen für eine Wundkorkbildung entstehen lassen!

Gegen das Lumen des Porus strecken sich reusenartig Periphysenbüschel, womit die innere Wandung des oberen Teiles des Gehäuses ausgekleidet ist. Sie ragen von oberwärts wie ein Fransendach gegen das grundständige Hymenium in den Hohlraum des Peritheciums. Die Periphysen sind zarte, faden- bis bandförmige Hyphengebilde, die alsdann als Paraphysen eine größere Ausbildung annehmen und die Asken weit überragen. Ihre langgestreckten bandförmigen oder uhrglasförmigen Hyphenglieder verzweigen sich und laufen meist in zipfelförmige Endglieder aus. Die Asci sind zylinderförmig bis keulenförmig mit abgerundeter Spitze und häufig kurz gestielt, 64—74 μ lang und 6—12 μ breit. Die Askosporen elliptisch, oft beidendig spitz ausgezogen, zweizellig, 8—19 μ lang und 4—6 μ breit, im Durchschnitt 13,8 μ lang.

Zu diesem Schlauchpilz gehört nun, wie auch meine Züchtungen ergaben, Fusidium candidum Willk. = Fusarium Willkommii Lindau als Konidienform. Die Angabe der Autoren, daß dies Fusarium die Nebenfruchtform von N. ditissima sei, ist von Weese in Zweifel gezogen worden. Allein mit Unrecht! Schon Brefeld[1]) züchtete aus den Askosporen der N. ditissima Tul. jene Fusarienform. Und Appel und Wollenweber[2]) berichten, daß zerdrückte Perithecien von krebsartig abgestorbenen Rindenpartien von Fagus silvatica auf Kartoffelstengel die schönsten Fusarienkonidien lieferten. Allerdings bemerken die Autoren: „Leider ist nicht einwandfrei zu behaupten, daß die Askosporen diese Fusarien gebildet hatten. Als nämlich nachträglich eine genaue Isolierung von Askosporen für diesen Nachweis vorgenommen worden war, stellte sich heraus, daß sie nicht mehr keimten. Die Zusammengehörigkeit von Keulenkonidien und Askosporen von N. ditissima ist aber bereits von Brefeld nachgewiesen und wiederholt bestätigt worden. Sie ist also auch hier nicht unwahrscheinlich.“

Die bisherigen Angaben über den genetischen Zusammenhang zwischen N. ditissima und Fusarium Willkommii kann ich nur bestätigen. Aussaaten mit Askosporen der N. ditissima, die ich schon früher und dann wieder im Dezember, Januar und Mai auf Gelatine und Pflaumendekokt, ausgekochten Weizenhalmstückchen und geschälten, gekochten Kartoffeln vornahm, ließen allemal das Fusarium Willkommii aus den Askosporen hervorgehen. Reinkulturen gelangen am besten auf Weizenhalm und Kartoffeln. Weiter darauf einzugehen, erübrigt sich, da Appel und Wollenweber[3]) die gründlichsten Beschreibungen über den Pilz in seinen Züchtungsformen gegeben haben. Erwähnt sei nur, daß die charakteristischen Keulenkonidien der Sporodochien am zahlreichsten auf Weizenhalm nach einigen Wochen vorkamen. Sie waren meist fünfseptig und von ziemlich gleichmäßiger Größe, 42—60 μ lang und 4—5 μ breit, seltener sechs- und noch seltener siebenseptig.

Was ferner in allen Kulturen auffällt, das ist die Erscheinung, daß erst nach einiger Zeit, gleichsam auf der Vegetationshöhe, die großen, kolbigen, fünf- und mehrseptigen Konidien auftreten. Und wenn Appel und Wollenweber[4]) die Quinquaseptata „mindestens als optimal, wenn nicht überhaupt als normale Spore“ bezeichnen, so trifft das sicherlich zu. Übrigens kommt die gleiche Fruktifikationsweise, wonach anfangs in den Kulturen kleinere Konidien mit geringerer Septenzahl erscheinen und erst später die größeren und mehrseptigen sich einstellen, ja auch bei anderen Fusarienformen vor.

Eine weitere, bei dieser Gelegenheit ausgesprochene Anschauung unserer Autoren kann ich indes nicht teilen. Sie vergleichen nämlich die Fusarienkonidien mit einer von einer gemeinsamen Gallertmembran umschlossenen, aus selbständigen Zellindividuen bestehenden Kolonie der Stephanosphaera pluvialis, einer Algenform aus der Familie der Volvoxineen, die sich bei günstiger Ernährung aus mehr Individuen zusammensetzt, bei ungünstigen Lebensbedingungen aus weniger und so zwangsweise ihre mutmaßlich phylogenetisch niederen Entwicklungsformen hervorbringen. „So auch bei unserem Fusarium, wo dieselben Erscheinungsformen der Fruktifikation zugleich atavistisch und ontogenetisch gedeutet werden können.“

Ganz abgesehen von dem doch etwas gewagten Vergleiche einer mehrzelligen Pilzspore mit einer Algenkolonie, so möchte ich in den kleineren und geringzahlig septierten Konidien zu Beginn der Fruktifikation oder bei ungünstigen Lebensbedingungen, insonderheit bei unzusagender Ernährung, in diesen Fruktifikationsprodukten des Pilzes möchte ich nicht phylogenetische Erscheinungsformen erblicken, sondern die Produkte des direkten Einflusses der zeitlichen und örtlichen Wachstumsbedingungen, worunter der Pilzorganismus steht. Es ist auch nicht einzusehen, weshalb gerade ungünstige Existenzbedingungen den Pilz auf eine frühere und niedrigere Entwicklungsstufe zurückwerfen sollten, von der wir uns auch nicht die geringste Vorstellung machen können. Sind denn die vermeintlichen früheren Entwicklungsstadien eines Pilzes, der als Fusarium Willkommii ja selbst nur eine besondere Entwicklungsform der Nectria ditissima ist, sind denn jene ehemaligen Stufen, wie sie durch geringere Konidiengröße und Septenzahl zum Ausdruck kommen sollen, in der Tat niedere Organisationsstufen eines Pilzes? Da müßte doch erst erwiesen sein, daß eine bedeutendere Größe und höhere Septenzahl der Konidie überhaupt eine vollkommenere Organisation bedeuten. Unmöglich kann aber die Organisationshöhe in quantitativen Eigenschaften, in einer numerischen Steigerung gleichwertiger Elemente liegen! Wie wir hieraus schon ersehen, so ist es ein heikel Ding, sich in phylogenetische Spekulationen einzulassen.

---

[1]) Vgl. die Angaben von Appel und Wollenweber a. a. O. p. 169.
[2]) A. a. O. p. 168.
[3]) A. a. O. p. 163.
[4]) A. a. O. p. 164.

Als eine verwandte Form des F. Willkommii führt Aderhold[1]) das Fusarium rhizogenum Pound et Clem. an, das er an Obstbaumwurzeln fand. Seine Kulturresultate stimmten soweit mit denen Brefelds von Nectria coccinea Pers. überein; Brefelds Abbildungen könnten direkt auf seinen Pilz übertragen werden, nur habe er stets vierzellige Sporen erhalten und das Mycel bilde Chlamydosporen, während F. Willkommii größere und 5—7-zellige Sporen hat, aber keine Chlamydosporen erzeugt. „Es stimmen aber, so bemerkt Aderhold, die Beobachtungen, wenn man von den Chlamydosporen absieht, auch nicht schlecht zu N. ditissima Tul., die man als Parasiten auf Apfel und Kirsche kennt. Trotz der Abweichungen, die meine Kulturen gegenüber denen, die Brefeld mit N. ditissima durchführte, zeigten, wollte es mir gar nicht unwahrscheinlich scheinen, daß mein Fusarium die Konidienform dieses Parasiten sei." — Die Unterschiede zwischen der als Fusarium Willkommii bekannten Art, die Brefeld aus N. coccinea Pers. = N. ditissima Tul. züchtete und der Fusariumform, die Aderhold auf den Wurzeln des Obstbaumes fand und als F. rhizogenum Pound et Clem. bestimmte, sind also nach Aderholds eigener Ansicht nicht bedeutend, so daß wir in seiner Form vielleicht eine Varietät des F. Willkommii zu sehen hätten. Aber immerhin ist sie mit F. Willkommii nicht identisch und vor allem nicht die Konidienform der Nectria ditissima Tul.

Eine zweite Fusariumform, deren Fruchtlager ich in der aufgesprungenen Rinde der brandigen Wundstelle des einjährigen Apfelzweiges fand, vergesellschaftet mit dem Fruchtlager des F. Willkommii, gehört in den Formenkreis des F. solani (Hart), wie ihn Appel und Wollenweber[2]) umschreiben (Fig. 4). Das biologische Verhalten dieses Pilzes glich dem seines Parasitengenossen. Wie F. Willkommii durchzog sein dichtes Mycel die gebräunten Gewebe der Knospe und des Achsenorgans. Wo es äußerlich zutage trat, wie an den Rändern der Deckblätter der Knospe und den auseinander getriebenen Blattlanlagen, sowie an dem gesprengten Periderm und dem bloßgelegten Rindenkörper des Zweiges, da war ein dichter Rasen von büscheligen Sporodochien mit reicher quirlständiger Verzweigung. Die Fusariumform steht Fusarium Martii App. et Woll. am nächsten. Die Konidien sind zum Teil stark gekrümmt, die Septenzahl ist 3—5, typisch 3. Die Basalzelle papillenartig bis schwach fußförmig ausgezogen, die Endzelle kegelförmig und hakig oder schnabelförmig unter einem Winkel von fast 45° gebogen. Bei den fünfseptigen Konidien ist die Papille deutlicher fußformähnlich. Es heißt zwar bei Appel und Wollenweber, daß die Basis der Konidien von F. solani, F. Martii und F. coeruleum Lib., welche jene Autoren den Formenkreis des F. solani ausmachen lassen, abgerundet ist oder mit papillenartigem, nie fußartigem Ansatzstück versehen. — Allein, durchmustere ich daraufhin die Konidienhaufen, zumal von dem natürlichen Substrate, so läuft die Basalzelle der Konidien gewöhnlich zwar papillenartig aus. Aber recht oft fand ich auch Konidien mit fußartiger Basis und deutlicher Hackenbildung. Und damit kommen wir auf den systematischen Wert dieser Formbildung. Sie kann kein ausschlaggebendes Artkriterium abgeben, wenn an ein und demselben Fruchtstande sowohl Konidien mit papillenartiger, wie mit fußartiger Basis entstehen. Wie denn überhaupt die ausgewachsenen Konidien nach Septenzahl, Krümmung, Größe, schlanker oder gedrungener Gestalt, nach Basiszelle mit ungleichförmigem Ansatzstück und ungleichförmiger Endzelle, größter Breite in der Mitte oder nach der Basis hin derart untereinander abweichen, daß sich leicht mehrere Variationsgruppen innerhalb des Artkreises aufstellen ließen. Die Größe der Konidien war 18—54 μ : 3—4 μ; 3—5-septige Konidien: 28—40 : 4 μ. Das Mycel des Pilzes auf der Knospe hatte eine schöne strohgelbe Färbung, ebenso in der Kultur auf gekochten Kartoffelstückchen; späterhin ward es dunkler. Die Sporodochien entsprangen von einem meist dreieckig gestalteten paraplektenchymatischen, gelben Stroma. Die älteren Kulturen wiesen ockerfarbige, oft perithecienähnlich gestaltete Konidienlager auf, die ebenfalls auf dem Zweige erschienen. Wie denn auch die Kulturen ferner knäuelartige Hyphenverflechtungen, Schleim- sowie Chlamydosporenbildung und durch Aneinanderlagerung derber Hyphenstränge koremienartige Bildungen zeigten, wodurch sich ja die meisten Fusarienformen auszeichnen.

---

[1]) Eine Wurzelkrankheit junger Obstbäumchen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. p. 621.)

[2]) A. a. O. p. 91.

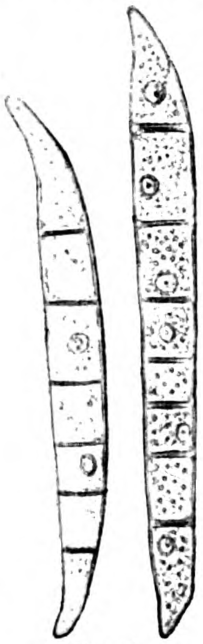


Fig. 3.

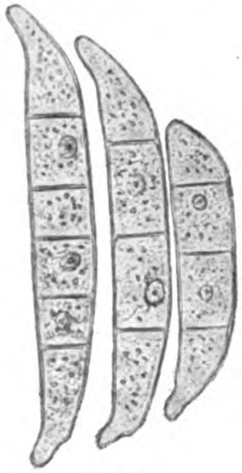


Fig. 4.

Dasselbe Fusarium fand ich wiederholt auf absterbenden Zweigen des bekannten Zierstrauchs Prunus triloba, und zwar sowohl im

Achsenorgan, wie auf den Knospen. Aderhold[1]) berichtet von einem Fusarium auf Prunus cerasus mit „sichelförmig gekrümmten Sporen, die ganz wie die von F. solani aussehen". Aber es sei weder mit F. cerasi Roll. et Ferr. das viel schmalere Konidien (2—3 μ) besitze, noch mit F. pallens Nees. identisch. Er nennt es deshalb Fusarium gemmiperda Aderh. Nach seiner Beschreibung und soweit dies die Abbildung der Aderholdschen Fusarium-Art erkennen läßt, stimmt unsere an den Apfel- und Prunuszweigen gefundene Fusariumform mit dem F. gemmiperda Aderhold überein. Es ist auch höchst wahrscheinlich, daß F. cerasi Roll. et Ferr. sowie F. pallens Nees. und F. gemmiperda Aderh. ein und derselbe und mit unserer Fusarium-Art übereinstimmende Pilz ist, was allerdings nur durch eine Vergleichung des frischen Konidienmaterials jener aufgeführten Formen miteinander zu entscheiden ist. Aber Konidienbreitenunterschiede, die oft auf Quellungen zurückzuführen sind, können nicht allein maßgebend für die Artunterscheidung sein. Und wenn Aderhold von seiner Form angibt, daß sie 4—5 μ breite Sporen habe und F. cerasi nur 2—3 μ, weshalb beide nicht identisch sein könnten, so ist demgegenüber zu bemerken, daß ich in den verschiedenen Konidienlagern des Fusarium auf Prunus triloba normale, ausgewachsene Konidien, 3 wie 4 und 5-septige, fast ebenso häufig mit den Breiten von 2—3 μ wie von 4—4,5 μ antraf.

Eine dritte Fusariumart (Fig. 3), die an den brandigen Knospenstellen des einjährigen Apfelzweiges vorkam, unterschied sich in den Konidien von der vorigen durch bedeutendere Größe, höhere Septenzahl, schlankere Gestalt, geringere Krümmung und anders geformte Basis- und Endzelle, kurz durch den ganzen Habitus, so daß beide Formen schon auf den ersten Blick auseinanderzuhalten sind. Größe: 40—58 μ : 4—5 μ; Septenzahl: 5—7; typisch 6; Höchstzahl 9. Gestalt schlank, nach beiden Enden der Konidie sich allmählich und nur schwach verjüngend, nicht wie bei F. metachroum App. et Wollw.; Endzelle ausgeprägt kegelförmig oder flaschenhalsförmig, leicht gebogen; Basalzelle von etwa gleicher Größe wie die Endzelle mit papillenartigem Ansatzstück. Eine fußartige Bildung kommt selten vor. Die Fruchtlager des Pilzes befanden sich, wie Querschnitte durch die brandige Stelle des einjährigen Apfelzweiges in der Höhe der infizierten Knospe lehrten, auf und unter dem abgesprengten Periderm, sowie in den Lücken der Gewebe des auseinandergetriebenen Rindenkörpers. Entweder erschienen die Konidien einzeln auf großen flaschenförmigen Konidienträgern, welche von den Fruchthyphen entsprangen, oder, was zumeist der Fall, die Fruchtlager erschienen in Gestalt büscheliger Sporodochien. Weiterhin entstanden auf dem Substrat höckerartige, ockerfarbige Konidienlager. In der Kultur auf gekochten Kartoffelschnittchen entstand schon nach einigen Tagen ein üppiges, flockiges Luftmycel, zunächst mit schwacher Konidienbildung, die späterhin reichlicher auftrat an büscheligen Sporodochien. Danach erschienen rotgelbe bis ockerfarbige Konidienlager und weiterhin eine schöne Blaufärbung des Substrats. Die Konidien waren anfangs dreiseptig, später fünfseptig; aber was auffiel: sechsseptige Konidien, die in der Natur typisch auftraten, erschienen in dieser Kultur nur ganz vereinzelt. Die dreiseptige Konidie, die zu Anfang der Fruktifikation die Mehrzahl abgab, war breiter als die spätere fünfseptige. Je höher also die Septenzahl, desto schlanker die Gestalt! In der Kultur erschienen sowohl breitere, kürzere und gekrümmtere, 3—4-septige Konidien, welche der vorhin beschriebenen Fusariumform des F. solani -Formkreises glichen, als auch schlankere, gerade, schmälere 4—5-septige, die bis auf die Septenzahl und geringere Länge mit den 5—6-septigen Sporen in der freien Natur übereinstimmten. Das macht es höchst wahrscheinlich, daß wir es hier mit Variationsformen einer Spezies zu tun haben, wennschon in der Natur diese dritte, an den Knospen eines einjährigen Apfeltriebes gefundene Fusariumform sich, wie bemerkt, in ihrer typischen Verkörperung von der vorigen deutlich unterscheidet durch ihre bedeutendere Größe, höhere Septenzahl und den fast geraden Wuchs.

---

[1]) Ein der Moniliakrankheit ähnlicher Krankheitsfall. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 11. 1901. p. 65.)

Die beschriebene Fusarienart gehört nach ihrem Habitus zu dem Formenkreis des Fusarium theobromae Appel et Strunk und des als Spicaria colorans beschriebenen Fusariums, zumal unter Zugrundelegung der von Appel und Wollenweber gegebenen Abbildungen[1]). Charakteristisch ist für die Art die winkelig gebogene flaschenhalsförmige Endzelle. Wären nicht die Größenunterschiede vorhanden, so stimmte unser Fusarium am meisten mit der sechsseptigen als Spicaria colorans von van Hall de Jonge benannten und wie F. theobromae auf Kakaofrüchten vorkommenden Fusariumart überein. Aber während unser Fusarium nur 40—54 μ : 3—4 μ hat, soll jene Form 59—90 μ : 6—9 μ Größe haben. Von F. theobromae unterscheidet es sich durch die Septenzahl, die bei diesem typisch 3—4 ist, bei unserer Form jedoch 6. Hinsichtlich ihrer systematischen Einreihung mag es vorerst mit der Zuweisung unseres Fusariums zu dem Formenkreise F. theobromae sein Bewenden haben, bis durch eine weitere vergleichende Betrachtungsweise und Züchtung auf verschiedenen Substraten und vor allem durch Auffindung der event. zugehörigen Schlauchfrucht festgestellt ist, ob wir es nicht in all diesen Fusarienformen wie F. solani, Martii, coeruleum, theobromae usw. mit einem großen und weitverbreiteten Kreise von Variationsformen oder biologischen Spezies zu tun haben, was ich annehmen möchte. Zu einer solchen Auffassung kommt man, sowie man die höher und nieder septierten, ausgewachsenen Konidien einer Form unter sich und die höher septierten Konidien der einen Art mit den typischen Konidien der anderen und höherzelligen Art nach ihrem Habitus vergleicht. Es ist tatsächlich rein willkürlich, welche Unterscheidungsmerkmale man bei der Artumgrenzung gelten lassen will, da kein einziges beständig und spezifisch ist, weder die Konidienseptierung und Krümmung, noch die Form der End- und Basalzelle, noch die Mycelfärbung und Größe. So gerät, wer schon unbedeutende Abweichungen hierin für die Artunterscheidung verwendet, gar leicht zu einer Artenfabrikation. Schließlich ist für die Auseinanderhaltung der Fusarienformen eine vergleichende Betrachtung des Gesamthabitus der einzelnen Formen und dessen bildliche Fixierung, soweit dies möglich, noch am wenigsten irreführend.

Eine Schlauchform zu den beiden letzten Fusarien habe ich nicht feststellen können, weder auf dem natürlichen Substrate, noch in den Kulturen[2]).

---

[1]) A. a. O. p. 39.

[2]) Es ist bislang auch nur für einige Fusarienformen die zugehörige Schlauchfrucht nachgewiesen. So für F. Willkommii Lind. die Nectria ditissima Tul. zuerst durch Brefeld. Wie Appel und Wollenweber (a. a. O. p. 63)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Empfänglichkeit der verschiedenen Obstsorten für die Krebskrankheit und die Immunität.

Seit die Krebskrankheit der Obstbäume bekannt ist, seitdem beobachtete man auch, wie unter denselben äußeren Bedingungen die einen Sorten mehr, die anderen weniger von der tückischen Krankheit heimgesucht wurden. Der Praktiker spricht deshalb von krebssüchtigen Obstsorten, wozu vornehm-

---

angeben, gelang Glück (1902) die Zucht der N. moschata Gck. aus einer Fusarienform; Butler (1910) gewann die Perithecien von Neocosmospora vasinfecta Smith. Ihssen führt für Fusarium nivale Sor. die Nectria graminicola Bertr. et Br. an, (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27), was Schaffnit (Mykolog. Centralbl. 1913. p. 257) dahin berichtigt, daß F. nivale zu Colonectria nivale Schaff. gehöre. Wenn indes Schaffnit sagt, daß dieser Pilz in der Natur so häufig auftrete, daß man sich darüber wundern müsse, daß der Zusammenhang von F. nivale mit seiner Schlauchfrucht bisher nicht erkannt sei, so fand ich Anfang Juli an dem Bestockungstriebe einer vorzeitig abgestorbenen, weißhalmigen und taubährigen Roggenpflanze unter den an jenem Triebe überaus zahlreichen und herdenweise auftretenden schwarzen Pykniden einer Ascochyta und den dunkelbraunen Pykniden einer Septoria und der Hendersonia herpotricha nur einige der kleinen lachsfarbigen Perithecien jenes Pilzes. Es hat sich denn auch herausgestellt, wie Schaffnit hinterher bemerkt, daß er die perithecienähnlichen ockergelben Konidienlager von Fusarium, wie man solche ja bei Fusarienformen in der Kultur regelmäßig antrifft, für Perithecien gehalten hat, was nach Schaffnits Meinung ebenfalls wohl Ihssen passiert sei. — Übrigens kann ich die Angaben Schaffnits über diesen Askomyceten im wesentlichen bestätigen. Ergänzend sei hierzu bemerkt, daß die nur spärlich auftretenden Paraphysen fädig sind, zipfelförmig oder spatelförmig auslaufend, mehrzellig, die Asci überragend. Die 2—4-zelligen, länglichen, beidendig zugespitzten, leicht gekrümmten Askosporen keimen überaus leicht. Die Konidien, die ich nach der Aussaat der Askosporen am 16. Juli auf gekochte Weizenhalmstücke nach 14 Tagen erhielt, waren kahnförmig, vorherrschend 2—3-septig, 25—26 μ lang und 3—4 μ breit. Die meisten ausgewachsenen 2—4-zelligen Konidien hatten die größte Sporenbreite im oberen Drittel. Dadurch erhielt die Konidie eine charakteristische Gestalt. Und uns, so heißt es ferner mit einem Hinweis auf spätere Mitteilungen kurz bei Appel und Wollenweber (a. a. O. p. 63), gelang die Züchtung der Schlauchform von Giberella saubinettii aus einem Fusarium, das jene Autoren F. rostratum benennen, da es sich mit keinem anderen deckt, und F. roseum, das sonst als Konidienform angegeben wird, eine Sammelspezies sei und nicht als Konidienform dieser Giberella weitergeführt werden dürfe. Sodann ließen sich aus einem Kakao-Fusarium unter dem Namen Nectria de Jonge die Schlauchfrüchte dieser Nectria züchten. — Insoweit kann ich die erstere Angabe unserer Autoren bestätigen, als ich aus den Askosporen der Giberella saubinettii auf gekochten Kartoffelstückchen und gekochten Weizenhalmstückchen, sowie auf Gelatine + Pflaumendekokt, welches Substrat von dem Pilze blutrot gefärbt wurde, ein Fusarium züchtete, das mit der von Appel und Wollenweber von F. rostratum gegebenen Abbildung übereinstimmte. Die meist 4—5-septigen Konidien mit gewöhnlich ausgeprägter fußförmiger Basalzelle waren 32—40 μ lang und 3—5,5 μ breit. Die Perithecien fand ich am Halmgrunde einer vorzeitig abgestorbenen Winterweizenpflanze im Juli. Die bei auffallendem Lichte dunkelsammetig, bei durchfallendem Lichte blau erscheinenden Perithecien saßen frei auf der Oberfläche des Substrats, strangartig locker umsponnen von Hyphen mit den Konidien des F. rostratum. Die spindelförmigen, leicht gekrümmten, vierzelligen Askosporen keimten sehr leicht und trieben in Wasser ansehnliche, alsbald zu kräftigen Hyphen auswachsende Keimschläuche. Bei den Züchtungsversuchen der beiden Pilze erhielt ich nun zwar aus der Schlauchform die Konidienform, aber aus dieser nicht wieder die Askusform. Sodann gab ich für Fusarium rubiginosum App. et Wollw. an (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 3. 1913. p. 43), daß dasselbe höchst wahrscheinlich die Konidienform von Ophiobolus herpotrichus Fries sei, eine Meinung, die indes falsch ist. Erneute Untersuchungen mit einer Reinkultur von der Askosporenkeimung bis zur Mycel- und Konidienbildung im verfolgbaren Zusammenhange haben mich überzeugt, daß nicht ein Fusarium, sondern ein Acremonium die Nebenfruchtform des Ophiobolus herpotrichus ist, worüber ich demnächst näher berichten werde.

lich die edelste unserer Apfelsorten, der weiße Wintercalvill, gehört. Wo in einer Baumpflanzung die Krebskrankheit erscheint, da sind gemeiniglich und selbst in einem erstklassigen Boden, so in meinem Garten, von den verschiedenen Sorten an erster Stelle jene Sorte, sowie der Ribston Pepping und die Kanada-Renette betroffen. Die ungleiche Empfänglichkeit der Sorten konnte ich auch experimentell in gewisser Weise nachweisen. Von zwölf Impfungen mit den Askosporen der Nectria ditissima, die ich im Frühjahr 1908 an den zweijährigen Zweigen gesunder, kräftiger Schnurbäume gleichen Alters und gleichen Standorts und der Sorten Goldparmäne, Schöner von Boscoop, Orange-Renette und Weißer Wintercalvill vornahm, indem ich die Sporenmasse in Rindeneinkerbungen übertrug, gelang nur die Impfung bei dem Wintercalvill-Apfel. Die Impfwunden an den Zweigen der anderen Versuchssorten waren nach einiger Zeit vollständig vernarbt, während die Wunde an dem Wintercalvillzweige nicht heilte, sondern die Gewebspartien in ihrer Umgebung nahmen in zunehmendem Umfange ein blasiges, brandiges Aussehen an, starben ab und sanken ein. Und im nächsten Frühjahr nach der Impfung hatte sich die charakteristische Krebswunde aus der ursprünglichen Impfwunde gebildet.

Daß ein nahrungsarmer oder feuchtkalter Boden, eine eingeschlossene, dumpfe Lage, eine unzureichende Baumpflege, sowie ein starker Baumschnitt oder einseitige, zumal überreiche Stickstoffdüngung die Entstehung der Krebskrankheit begünstigen, hat die praktische Erfahrung gelehrt. Sie, diese äußeren Lebenszustände, worunter der Baumorganismus zubringt oder worin er versetzt wird, bewirken zunächst Ernährungsstörungen und einen allgemeinen Schwächezustand, welcher den Organismus empfänglicher und widerstandsloser für schädigende Angriffe macht, zumal parasitärer Natur. Tatsache ist ferner, daß jüngere Bäume in kräftigem, gesunden Wachstum widerstandsfähiger gegen parasitäre Krankheiten sind, als ältere derselben Sorten und des gleichen Standorts. Aber mit all dem ist nichts gesagt, was uns eine Einsicht in das ungleiche Verhalten des Baumorganismus gibt. Worauf die größere oder geringere Widerstandsfähigkeit der einzelnen Obstsorten und Individuen gegen die Krebskrankheit beruht, davon, wie überhaupt von dem Wesen der Immunität haben wir gar keine Vorstellung. Unsere mechanisch-physikalischen Erklärungsversuche dieser Erscheinungen versagen da letzten Endes. Zwar ist man, wie im ersten Teil unserer Arbeit bereits erwähnt, der Frage der Immunität experimentell näher getreten. Nach Münch[1]) soll die Immunität und die größere oder geringere Empfänglichkeit für die Krebskrankheit mit dem Wassergehalt der Gewebe zusammenhängen, wie früher schon mitgeteilt. Ein schwammiges und deshalb poröses und luftreiches Gewebe, hervorgerufen durch Fäkaldüngung, ist nach unserem Gewährsmann krebssüchtig. Also allgemein: ein wasserreiches und deshalb luftärmeres Zweigwerk ist krebsgefeit und pilzunempfänglich; ein wasserarmes und luftreiches Gewebe dahingegen pilz- und krebsempfänglich!

Allein, meine hierauf bezüglichen und im Februar dieses Jahres angestellten Infektionsversuche vermögen jene Münchsche These nicht zu stützen. Eine Anzahl einjähriger, 20 cm langer, abgeschnittener und mit der Endknospe versehener Zweigtriebe der Blenheims-Renette wurden in fünf Serien unter ungleiche äußere Bedingungen versetzt und mit dem aus den Askosporen der Nectria ditissima in Reinkultur auf Gelatine und Pflaumendekokt gewonnenen Mycel geimpft. Und zwar ward das Mycel, sowie auch zerquetschte Perithecien der N. ditissima in die einzelnen, den Zweigstücken beigebrachten Kerbschnitte übertragen. Vier Zweigtriebe wurden, nachdem sie mit dem Nectria-Mycel geimpft waren, am 1. Februar sofort in ein Glas, dessen Boden mit Brunnenwasser bedeckt war, in Stubentemperatur gestellt. Die abgeschnittenen und in Wasser gestellten Jahrestriebe schlugen aus, die Endknospen wuchsen zu Blättern aus. Am 13. März wurden die Impfwunden untersucht. Querschnitte durch diese zeigten, daß das Mycel nicht in den Gewebekörper des Achsenorgans eingedrungen war. Vereinzelt fanden sich Hyphen interzellular in den abgestorbenen Gewebspartien. Das Rindenparenchymgewebe, primäres wie sekundäres, je nach der Tiefe der Impfwunde, hatte nach vier Wochen eine Wundperidermzone gebildet, welche das abgestorbene Gewebe von dem gesunden schied. Die Zone war zusammenhängend, vom Kollenchym ausgehend und unter dem abgestorbenen Gewebe hinstreichend. — Eine andere Zweigserie wurde 24 Stunden nach der Trennung vom Baume geimpft und in ein wasserleeres Glas in Stubentemperatur gestellt. Am 25. Februar untersuchte ich zwei Zweige. Unter der Lupe ließ sich erkennen, daß das auf die Impfwunde gebrachte, inzwischen trocken gewordene Mycel frische Hyphen getrieben hatte, die gleich straffen Bändern nach der Wundoberfläche gingen. Aber wie die mikroskopische Untersuchung auswies an Querschnitten durch die offene Wundpartie, so waren die Hyphen weder in das Rindengewebe, noch Holzgewebe eingedrungen. Sie befanden sich zwischen den verletzten und abgestorbenen Rindenparenchymzellmassen und freigelegten Markstrahlzellen. In unverletzten Zellen, sowie in den Gefäßen war keine Spur von Mycel zu entdecken. Um nichts weiter war das Mycel am 12. März gelangt. In der Kambialregion, welche der Schnitt getroffen und wo das Mycel aufgetragen war, zeigten sich die Hyphen zwischen den zerknüllten, abgestorbenen Zellen, ohne daß sie jedoch weiter in die Gefäße oder Markstrahlzellen oder Holzparenchymzellen eingedrungen wären. Die pritte geimpfte Zweigserie ward bei milder Witterung am 9. Februar sofort nach der Trennung vom Baume in einen Topf mit feuchter Gartenerde gesteckt und im Freien belassen. Als nach vier Wochen die Impfstellen untersucht wurden, ergab sich, daß das Mycel in dem bloßgelegten, abgestorbenen und gebräunten Rindenparenchym zwischen den Bastbündeln wucherte. Ein Wundperiderm war nicht gebildet.

---

[1]) A. a. O.

Am 12. Februar wurden sodann sechs einjährige, 20 cm lange, mit Endknospen versehene Zweige der Blenheims Renette in ein angefeuchtetes, mit Korkstöpsel locker geschlossenes Zylinderglas in Stubentemperatur gebracht. Ihre Impfung war in der Weise vorgenommen, daß Mycel aus den Askosporen der N. ditissima sowie zerquetschte Perithecien dieses Pilzes auf das unverletzte Periderm, sowie auf besonders große Lentizellen gelegt wurden. Am 13. März, also nach vier Wochen, war das Mycel auf den Zweigtrieben in der feuchten Atmosphäre des Glaszylinders noch frisch. Aber die Impfzellen ließen keinerlei Spuren irgendeines aggressiven Vorgehens des Parasiten gegen den Gewebekörper ihres Nährwirts erkennen. Die Sporen der zerdrückten, auf die Rinde aufgetragenen Perithecien hatten Keimschläuche getrieben, die zu Mycel ausgewachsen waren, das über die Rinde streckenweise hinkroch, ohne daß das Periderm jedoch weiter angegriffen war. Wo die zerdrückten Perithecien auf den Lentizellen lagen, da durchzogen Hyphen die gelockerten, oberen Zellschichten des Füllgewebes. Aber sie waren nicht weiter in das Füllgewebe der Lentizellen vorgedrungen. Daß eine Infektion, wie Goethe[1]) angibt, durch die Lentizellen erfolge, vermag ich also nicht zu bestätigen. Damit ist freilich nicht gesagt, daß solches überhaupt nicht vorkommen könnte.

Eine fünfte Serie am 18. Februar geimpfter Apfelzweige bestand aus zweijährigen Zweigstücken der Blenheims Renette, die in einer ab und zu angefeuchteten Petrischale in Stubentemperatur aufbewahrt wurden. Die Impfwunden waren Schälwunden, die bis auf den Holzkörper gingen. Und auf diese Zweigwunden wurden zerdrückte Perithecien der Nectria ditissima gelegt, also eine Wundinfektion vorgenommen, wie sie wohl häufig in der Natur vorkommt, indem verschleppte Perithecienteile in Zweigwunden der Bäume gelangen. Schon nach acht bis zwölf Tagen konnte man mit bloßem Auge erkennen, daß eine Sporenkeimung und Mycelbildung vor sich gegangen war. Straffe Pilzfäden verliefen nach den Wundrändern. Und in der Tat, von allen bisherigen Impfungen an Zweigen, im ganzen 32, waren hier die Impfungen am erfolgreichsten. Es fand sich ein kräftiges Mycel auf den Impfwunden der in der feuchten Kammer sich wochenlang frisch erhaltenen Zweigstücke vor. Unter dem Mycel war das Rindengewebe stark gebräunt und hatte seine Struktur vollständig eingebüßt. Wo die Zellstruktur sich noch erkennen ließ, da waren die Zellen schalenförmig mit einem grobkrümeligen, gelbbraunen Inhalte, sonst eine tiefbraune bröckelige Masse. An der Wundstelle hob sich, da die bisherige Spannung durch den Peridermgürtel ja infolge des weggeschnittenen Rindenteils aufgehoben war, der Rindenkörper vom Holzkörper in der kambialen Region ab. Und quer durch die so entstandene Lücke in Gestalt eines ringförmigen Spalts zogen vereinzelte Hyphen und drangen in die einen und anderen der gebräunten Markstrahlzellen ein. In einem Präparat erschien auch im Gefäßlumen eine Hyphe. Wo im Kollenchym solche, durch den aufgehobenen Rindendruck entstandenen Spalten auftraten, da sah man wohl eine Hyphe längs der äußeren Zellwandungen der an den Spalt stoßenden Zellage hinstreichen. Die Hyphen drangen zwischen die dicken Zellwandungen der Rindenparenchymzellen interzellular ein.

Späterhin, als die Zweigstücke vertrockneten, griff das Mycelwachstum stärker um sich. Die Hyphen durchsetzten inter- und intrazellular den Gewebekörper. Und da erschienen denn auch auf der freien Wundfläche, zumal an den Wundrändern im Rindenteil eines Zweigstückes herdenweise rotbraune Fruchtkapseln, die man für Perithecien des Nectria-Pilzes halten konnte, welche aus dessen Konidienlager hervorgegangen waren. Die mikroskopische Untersuchung ergab indes, daß wir es in den zitronenförmigen Fruchtkapseln mit den Pykniden einer Phyllosticta zu tun hatten, die sich auf der Impfwunde angesiedelt. Ob nicht auch Brzezinski[2]) auf ähnliche Weise zu seiner angeblichen Pyknidenform der Nectria ditissima gelangt ist, das zu vermuten, liegt nach unserem Befunde recht nahe. Wo träfe man nicht auf abgestorbenen Vegetabilien die Phyllosticta-Pilze an, die fast ebenso häufig erscheinen wie die Schimmelpilze! Obwohl die infizierten Zweigstücke vom Februar bis August in der von Zeit zu Zeit angefeuchteten Petrischale zubrachten und eine üppige Fusariumvegetation in ihrem Gewebekörper entstanden war, so kam es auf den Impfwunden doch zu keiner Perithecienbildung, wie sie nach zehn

---

[1]) A. a. O.

[2]) A. a. O.

Wochen nach der Impfung unter gleichen Verhältnissen von Goethe beobachtet wurde.

Die elliptischen Pyknosporen der Phyllosticta auf der vom Nectria-Mycel durchwachsenen Impfwunde säete ich am 4. August auf einen aus Gelatine und Pflaumendekokt hergestellten Nährboden. Schon nach einigen Tagen hatten die kleinen Pyknosporen Keimschläuche getrieben und ein Mycel gebildet, das recht kräftig heranwuchs. Und am 11. August zeigten sich die ersten Pykniden auf dem Substrat, die, wie ihr Sporeninhalt, mit denen in der Natur übereinstimmten, was von vornherein ja anzunehmen war. Die Phyllosticta-Form hat mit der Nectria ditissima nichts zu tun! Das üppig entwickelte Mycel des Pyknidenpilzes glich in keiner Weise dem Nectria- bzw. Fusarium-Mycel.

Wie mit den Konidien und Mycel des Fusarium Willkommii, so hatte ich auch mit dem vorhin beschriebenen, zum Formenkreis des F. solani gehörigen Fusarium an einjährigen und in der feuchten Kammer aufbewahrten Apfelzweigen Impfungen vorgenommen, indem in Reinkultur gezogenes, konidienhaltiges Fusarium-Mycel auf Schälwunden des Achsenorgans gelegt wurde. Die am 21. Juni geimpften Zweigstücke zeigten am 2. Juli an den untersuchten Querschnitten durch die Impfwunde, daß wie bei F. Willkommii der Pilz in den durch den Schnitt freigelegten Gewebeteilen, zumal in dem gebräunten, abgestorbenen Rindenparenchym, sowie im Kollenchym interzellular kräftig wuchs und gegen die anscheinend noch lebenskräftigen Zellpartien vorgedrungen war. Streckenweise hatte die unter der verwundeten und abgestorbenen Zellzone gelegene Zellreihe des Rindenparenchyms durch tangentiale Zellteilung den Anfang zur Bildung eines Meristems gemacht, so daß statt der runden Rindenparenchymzellen gegen den Wundrand hin viereckige, radiär angeordnete Parenchymzellen auftraten. Irgendeine Zellverkorkung war indes, wie die Suberinreaktion auswies, nicht erfolgt.

Die Phyllosticta-Ansiedelung war bei der Art der Impfversuchsanstellung nicht zu verhindern und auch nicht beabsichtigt. Wie man denn bei allen derartigen Versuchen möglichst im Rahmen der natürlichen Verhältnisse und Lebensbedingungen bleiben sollte. Anders sind aus den Versuchsanstellungen keine berechtigten Schlüsse auf die Vorgänge und Erscheinungen in der Natur abzuleiten. Wennschon, wie bei unseren Versuchen, die Gewebe der abgeschnittenen Zweige eine Zeit lang lebend bleiben, zumal wenn die Zweigtriebe in Wasser gestellt sind, wie das Austreiben der Knospen und die Wundperidermbildung bewies, so gehen nach der Trennung der Zweigteile vom Baume und somit der Unterbrechung aller bisherigen, auf die normale Ernährung und das Wachstum bezüglichen Funktionen in den Zellen dennoch gewisse Veränderungen vor sich, die sich auf osmotische Vorgänge, Stoffumsetzungen und Stoffwanderungen beziehen und die um so abnormaler werden, je weiter der Zeitpunkt von dem Trennungsakte der Zweige zu liegen kommt. Das bleibt auch bei unseren Impfversuchen zu bedenken.

Was aber lehren nun die geschilderten Impfversuche? Vor allem, daß der Wassergehalt der Gewebe für die Besiedelung des Krebspilzes und die Immunität der Obstbäume nicht diejenige ausschlaggebende Rolle spielt, die ihr Münch zuerteilt. Wäre das der Fall, so müßten die Zweigtriebe unserer zweiten Versuchsserie, die wasserarm und luftreich waren, von dem Pilz nach vier Wochen zum mindesten in den oberflächlichen bloßgelegten Gewebspartien durchwuchert sein, was nicht geschehen war. Ebensowenig hatte der Krebspilz während jenes Zeitraumes sich Eingang verschafft in die Zellage unterhalb der Wundfläche der in Erde gesteckten Versuchszweige im Freien. Dahingegen waren umgekehrt die Impfwunden jener in der feuchten Kammer aufbewahrten, also wasserreicheren und luftärmeren Zweigstücke von dem Pilze in der gleichen Zeit durchsetzt. Die Hyphen waren, soweit sich das nach dem Aussehen der betreffenden Zellpartien erkennen ließ, in die noch nicht abgestorbenen Gewebsteile des Rindenkörpers interzellular eingedrungen.

Auf Grund unserer Befunde können wir daher den experimentellen Beweis, daß die Krebsempfänglichkeit der Obstbäume von dem Wasser- und Luftgehalte der Gewebe ausschlaggebend abhänge, für nicht erbracht erachten. Ein rein mechanisch-physikalisches oder chemisches Moment, ein einzelner äußerer Lebensfaktor, wie Luft, Wasser, Licht, Temperatur kann in seiner Steigerung über ein bestimmtes Maß der Einwirkung hinaus wohl das Verhalten des Organismus einzig und allein bestimmen, insofern als er zerstörend in das bisherige Gleichgewicht seiner Lebenstätigkeiten eingreift und diese schließlich oder, was dasselbe sagt, das Leben zum Erlöschen bringt. Aber so lange nicht ein solcher katastrophaler Zustand des Zellplasma eintritt, so lange hängt sein Verhalten von dem Zusammenwirken eines Komplexes äußerer und innerer Bedingungen ab und nicht von einem einzelnen Lebensfaktor, wie etwa von dem Wassergehalte der Zellen, welche die Infektionshyphen des Krebspilzes angreifen. Und in dem feindlichen Kontaktverhältnis des Pilzes mit seinem Nährwirt, wo beide aufeinander reagieren, da werden Widerstände überwunden und Hemmungen beseitigt. Es kommen Wechselwirkungen zwischen den beiden verschiedenen, gegeneinander agierenden Lebenssubstanzen zustande, die sich unserer Beobachtung vollständig entziehen. Wechselbeziehungen, die eben Äußerungen dessen sind, was wir, unerkannt, Leben nennen, die aber sicherlich ganz anders verlaufen, als der chemische Umsetzungsprozeß der aufeinander wirkenden Stoffe im Reagensglase nach der vom Menschengeist ausgeklügelten Mechanik der Atome. Scheidet doch eins vor allem bei dem chemischen oder mechanisch-physikalischen Prozesse aus: das ist die Anpassungsfähigkeit an veränderte Bedingungen!

Ob wir nun das stoffliche Aufeinanderwirken der beiden ungleichen Lebenssubstanzen, des aggressiven Pilzparasiten und des Zellorganismus der Wirtspflanze, wobei die allgemeinen Lebensbedingungen, wie Luft, Wasser, Licht, Temperatur in ihrem wechselnden Maße die verschiedenartigen Vorgänge in einer abhängigen Beziehung unterhalten nach der größeren oder geringeren Entwicklung der Energien, ob wir das nun einen Kampf zwischen jenen beiden nennen wollen oder nicht, das ist für den Vorgang an sich gleichgültig. Jedenfalls ist erwiesen, daß die Bildung von Schutz- oder Korkgeweben und die toxineschen oder enzymatischen Zellausscheidungen den Pilzparasiten an einem Vordringen in den Nährwirtskörper hindern. Und dieser Tatsache „vom aktiven Widerstande der Zellen gegen den feindlichen Pilz“ ist dadurch nicht „der Boden entzogen“, daß, wie Münch[1]) behauptet, tote Holzstücke bei hohem Wassergehalte sich genau so immun gegen Pilzangriffe und bei hohem Luftgehalt genau so empfänglich wie lebende Stücke erwiesen, was übrigens auch nicht allemal der Fall ist, wie wir vorhin sahen.

---

[1]) A. a. O.

Allgemeine Ergebnisse.

Die Anschauung über die Natur der Krebswunde, wie sie vornehmlich von R. Goethe vertreten ist und wonach die charakteristischen, aus konzentrischen Wulstbildungen bestehenden Wunden an den Achsenorganen der Apfelbäume ihre Entstehung der Nectria ditissima und nicht Frostwirkungen verdanken, entspricht mehr den Tatsachen, als die gegnerische Ansicht, welche die konzentrischen Überwallungswülste in erster Linie auf Frostwirkungen zurückführt. Und zwar vermag nicht nur Nectria galligena, sondern auch N. ditissima echte Krebswunden zu erzeugen. Wie denn auch der in der Krebswunde erscheinende Konidienpilz Fusarium Willkommii nicht etwa die Nebenfruchtform von Nectria galligena, sondern von N. ditissima ist.

Im Rinden- wie im Holzkörper der Krebswunde treten Störungen und besondere Abweichungen von dem normalen Bau der Gewebe hervor, die sich weit über den Wundumfang hinaus erstrecken. Äußerlich kommen sie durch eine auffällige Anschwellung des Gewebekörpers der Wundregion und ihrer Nachbarschaft, sowie in einem hypertropischen Wachstum der Gewebselemente zum Ausdruck. Im Holzkörper der Krebswunde erscheint als ein noch undifferenziertes Gewebe wie auch sonst in dem Regenerate bei Verwundungen des Achsenorgans ein Parenchymholz- und Markstrahlzellgewebe. Starke Verwerfungen der Holzgewebselemente, der Fasertracheiden (Wimmerholz), ihr sowie das Zurücktreten der trachealen Elemente und die abweichende Gestaltung und Größe der Markstrahlzellen und der Holzparenchymzellen, andererseits wieder die stellenweise starke Ausbildung der Gefäße auf Kosten der Holzfasern, das sind weitere abnormale Gewebeerscheinungen im Holzkörper der Krebswunde. Im Rindenkörper ihrer Überwallungswülste zeigen sich die Störungen und Abweichungen in der massigen Ausbildung des Rindenparenchyms mit ungewöhnlich großen Zellen, ferner in dem wellenförmigen Verlaufe der Rindenmarkstrahlen und ihrem streckenweisen vollständigen Aufgehen in die Rindenparenchymzellen, sodann in dem Fehlen oder in der geringen Ausbildung eines Kollenchymgürtels, eines Bastfaserringes und eines Siebröhrenapparates oder andererseits in einer starken Ausbildung gerade der Bastbündelregion und in der großen Tüpfelung der Siebröhrenzellen und der Größe der Geleitzellen. Alles Unregelmäßigkeiten, die bezeichnend sind für regenerierte Gewebeformen.

Es ist vielleicht gestattet, in den so auffälligen Wachstumsbildungen der Überwallungswülste der Krebswunde myzetogene Gewebshypertrophien zu sehen, wie sie in ausgesprochenem Maße u. a. das Rindengewebe des von Cystopus candidus befallenen Achsenorgans der Capsella bursa pastoris zeigt. Eine ähnliche myzetogene Gewebshypertrophie tritt bei den Pallisadenzellen des von Fusicladium dendriticum befallenen Apfelblattes auf¹).

Über die Entstehung der Krebswunde gibt uns sodann eine junge, mit der Konidienform der Nectria ditissima, dem Fusarium Willkommii Lind., behaftete Wunde in der Umgebung einer Knospe eines einjährigen Apfelzweiges Aufklärung, insofern als sie zeigt, wie in der betreffenden brandigen, blasig aufgetriebenen und geplatzten Rindenpartie

---

¹) Vgl. Voges, E., Zum Parasitismus von Nectria und Fusicladium. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 548.)

das Mycel des Krebspilzes wuchert und die Gewebe zum Absterben bringt und gegen die gesunden Gewebeteile vordringt, wobei es in dem Rindenparenchym streckenweise zu einer lebhaften Zellteilung und zur Bildung einer Meristemzone kommt, welche sich zwischen die abgestorbene und lebende Geweberegion schiebt.

Aber nicht nur Nectria ditissima bzw. Fusarium Willkommii ist ein parasitärer Bewohner des Zweigwerks der Apfelbäume, sondern auch noch zwei andere Fusarienformen, welche dem Formenkreise des Fusarium solani und des F. theobromae Appel et Wollw. angehören. Ihr parasitäres Verhalten gleicht dem des F. Willkommii. Gegen ihre Angriffe, wie sie sich als deren Folge in der Krebskrankheit zeigen, verhalten sich die verschiedenen Obstsorten zwar ungleich. Aber dieses ungleiche Verhalten, sowie die Immunität der einzelnen Individuen auf den Wassergehalt der Gewebe zurückzuführen, so zwar, daß von einem Gesetze gesprochen werden könnte, wonach ein wasserreiches und daher luftarmes Gewebe krebsgefeit und pilzunempfänglich mache, ein wassserarmes und luftreiches Gewebe jedoch pilz- und krebsempfänglich: dieses angebliche Gesetz ließen unsere daraufhin unternommenen Impfversuche nicht erkennen. Andererseits heißt es[1]), daß Pythium de Baryanum gerade die wasserreichen Sämlinge von Cruciferen angreift, während Landpflanzen minder leicht befallen werden, jedoch stark heimgesucht, sobald sie unter Wasser gebracht sind.

Wohl aber belehrten die Impfergbenisse uns über die parasitäre Natur der Fusarienpilze. Daß die hier in Frage kommenden Formen Fusarium Willkommii, F. solani var. und F. theobromae var. aber in ihren Nährwirt selbsttätig einzudringen vermöchten, wie solches von Nectria ditissima seitens Goethes und Lapines[2]) behauptet wird, wonach der Krebspilz auch in unverletzte Zweige durch die Lentizellen einen Eingang finde — das konnte ich nicht bestätigen. Es ist gewiß zutreffender, hier von Wundparasiten zu reden, wie dies ja zumeist auch geschieht.

Wir sehen, wie der Pilz von außen gegen das Innere des befallenen Gewebekörpers des Achsenorgans seinen Weg nimmt, indem er sich gleich einem Keile zwischen die dicken Zellwandungen drängt und die Zellen auseinandertreibt, die vorher abgestorben sind. Wo der freigelegte krebsige Rindenkörper klaffende Interzellularen hat, da tauchen die Hyphen auf und ziehen längs der freien Zellwandungen der noch lebenden Zellen hin. Der Pilz erscheint hier also als Epiphyt. Innerhalb lebender Zellen habe ich jedoch seine Hyphen nicht gefunden. Wie denn überhaupt das Mycel der Nectria in den tieferen Gewebelagen der Krebswunde nur spärlich erscheint. Der eigentliche Sitz des Pilzes ist in den oberen abgestorbenen Gewebepartien. Aber deshalb kann man doch nicht die Fusarieniplze für Saprophyten erklären.

Erwiesen ist, daß sie lebendes Gewebe abtöten. Und zwar muß diese Abtötung durch eine intensive Fermentausscheidung des Pilzes geschehen, die überaus giftig auf die Lebenssubstanz der Zellgewebe wirkt. Denn diese sind in weiter Entfernung von dem Sitz des Pilzes abgetötet. Und das nicht allein. Das Ferment muß auch über die Abtötungsgrenze hinaus auf die

---

[1]) de Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze. Leipzig 1884. p. 411.

[2]) A. a. O.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

nächste Geweberegion als Reiz zu einem hypertrophischen Zellenwachstum wirken, bis denn auch diese Überwallungswülste bei dem weiteren Vordringen des Pilzes dasselbe Schicksal ereilt wie den bereits von den Wundparasiten in Besitz genommenen Gewebekörper des Achsenorgans, der schließlich, seines Rindenteils beraubt, vollständig als ein verdorrter Holzstrunk übrig bleibt.

Ebenso sehen wir bei dem Parasitismus der Blattfleckenpilze der Obstbäume Septoria, Phyllosticta, Hendersonia und der Fusicladium-Pilze, daß, wo deren Sporen festen Fuß gefaßt und in die Kutikula und Epidermis eingedrungen sind, da in der Umgebung die Zellen absterben, noch ehe die Hyphen von ihnen Besitz genommen haben.

In dem aggressiven Vorgehen der Pilze, welche bei der Besiedelung ihres Nährwirts dessen Gewebekörper in seinen heimgesuchten Zellen abtöten, hierin haben wir den Pilzparasitismus zu erblicken. Ob jedoch die Hyphen des Pilzes in einer noch lebenden Zelle zubringen und aus ihr die Nährstoffe beziehen, oder ob aus einer durch seine Fermentausscheidungen zuvor getöteten, dieser Unterschied darf kein Kriterium für den Parasitismus abgeben. Es kann bekanntlich der Parasit auch zum Saprophyten, wie dieser zum Parasiten werden. Und nach der Art dieses Verhaltens in seinen Abstufungen hat man die Pilze unterschieden in ihrer Ernährungsanpassung¹). Wie sich indes der Chemismus des Stoffwechsels des Pilzes in dem lebenden Zellgewebe und in dem abgestorbenen vollzieht, davon haben wir keine Vorstellung. Nur soviel wissen wir, daß der Ernährungsprozeß der Inquilinen schließlich in beiden Fällen auf dasselbe hinausläuft. Insofern nämlich, als der Pilz aus der organischen Substanz seines Zellenwirtes sich bestimmte Stoffe zu eigen macht, vornehmlich die Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen ausnutzt. Welche molekularen Wechselbeziehungen aber nun zwischen seiner Lebenssubstanz und der seines Opfers oder der toten Substanz bestehen, das wissen wir nicht. Was ist lebend und was ist tot in der nächsten Umgebung des Pilzinquilinen? Worin besteht der Unterschied zwischen lebenden und leblosen Molekeln? Wie der Stoffumsatz und wie die Stoffzerspaltungen zwischen dem Protoplasten der Pilzzelle und der Nährlösung außerhalb derselben in dem lebenden und in dem abgestorbenen Zellgewebe des Pilzwirtes vor sich gehen und welche osmotischen Vorgänge hierbei eine Rolle spielen: von all dem haben wir keine Ahnung! Das sind Lebensgeheimnisse, welche der menschlichen Einsicht noch verschlossen bleiben. Und in ihnen liegt das Wesen des Pilzparasitismus!

Literaturverzeichnis.

Aderhold, R., Impfversuche mit Nectria ditissima Tul. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. 1903. p. 763.)

—, Eine Wurzelkrankheit junger Obstbäumchen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. p. 621.)

—, Ein der Moniliakrankheit ähnlicher Krankheitsfall. (Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 11. 1901. p. 65.)

Appel, O. u. Wollenweber, H. W., Grundlagen einer Monographie der Gattung Fusarium. (Arb. a. d. Biolog. Anst. f. Land- u. Forstw. Bd. 8. 1910.)

Brzezinski, J., Le chancre des arbres, ses causes et ses symptômes. (Bull. de l'Acad. d. scienc. de Cracovic. Cl. d. scienc. mathém. Mars 1903.)

—, Einige Bemerkungen über die Krebs- und Gummikrankheit der Obstbäume. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904. p. 632.)

---

[1] Vgl. de Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze. Leipzig 1884. p. 382.

Goethe, R., Mitteilungen über den Krebs der Apfelbäume. Leipzig 1877.
—, Weitere Mitteilungen über den Krebs der Apfelbäume. (Landwirtsch. Jahrb. Bd. 9. 1880. p. 837.)
—, Zum Krebs der Apfelbäume. (Botan. Zeitg. 1884. No. 25.)
—, Über den Krebs der Obstbäume. Berlin 1904.
Haberlandt, G., Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig 1909. p. 617.
Hartig, Robert, Die krebsartigen Krankheiten der Rotbuche. (Zeitschr. f. Forst- u. Jagdw. Bd. 9. 1877.)
—, Der Krebs der Laubholzbäume. (Unters. a. d. forstbot. Instit. München. Bd. 1. 1880.)
—, Lehrbuch der Pflanzenkrankheiten. Berlin 1900.
Küster, E., Pathologische Pflanzenanatomie. Jena 1903.
Lapine, L., Zum Krebs der Apfelbäume. (Landw. Jahrb. Bd. 21. 1892.)
Münch, E., Untersuchungen über die Immunität und Krankheitsempfänglichkeit der Holzpflanzen. Ludwigsburg 1909.
Rosenthal, Die Enzyme und ihre Wirkung. (Biolog. Centralbl. 1911. p. 187.)
Schaffnit, E., Der Schneeschimmel und die übrigen durch Fusarium nivale Ces. hervorgerufenen Krankheitserscheinungen des Getreides. (Landwirtsch. Jahrb. Bd. 43. 1912.)
Sorauer, P., Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Bd. 2. 1909.

Erklärung der Abbildungen.

Fig. 1. Querschnitt durch die Krebswunde eines fünfjährigen Apfelzweiges. äußere Wundfläche, Holzblöße; n Spalt; r Rindenkörper; v Holzkörper. Lupenvergr.

Fig. 2. Querschnitt durch den Holzkörper der Krebswunde eines fünfjährigen Apfelzweiges in der Spaltregion n der Fig. 1. (Halbschematisch.)

s Spalt im Holzkörper mit Gewebedetritus o an den Spalträndern und im Spaltlumen; r Wundkorkschicht; v Parenchymholzgewebe m oberhalb des Spaltes, worin partienweise normales Holzgewebe in Gestalt von Fasertracheiden n und Tracheen m erscheinen; w Markstrahlen aus dem Parenchymholz- bzw. Markstrahlzellgewebe aufsteigend; a Gefäße des normalen Holzteils unter dem Spalt, mit Wundgummi gefüllt. Vergr. 120.

Fig. 3. Konidien des dem Formenkreise des Fusarium theobromae App. et Wollw. angehörigen Fusarium spec. Vergr. 700.

Fig. 4. Konidien des dem Formenkreise des Fusarium Solani Mart. zugehörigen Fusarium spec. Vergr. 700.

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Cunningham, Andrew, and **Löhnis, F.,** Studies on Soil Protozoa, p. 596.
Gainey, L. P., Effect of CS_2 and Toluol upon Nitrification, p. 584.
Münter, F., Über Stickstoffumsetzungen einiger Aktinomyceten, p. 561.
Rettger, Leo F., The Bacteriology of the Hen's Egg, with special Reference to its Freedom from microbic Invasion, p. 611.
Theißen, F., Trichopeltaceae n. fam. Hemisphaerialium, p. 625.
Voges, Ernst, Zur Geschichte und Entstehung des Obstbaumkrebses, p. 641.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 20. Dezember 1913.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 39. No. 26.
Ausgegeben am 28. Januar 1914.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 39 enthaltenen Arbeiten.

Abderhalden, Emil, Schutzfermente des tierischen Organismus. 116
— und **Fodor, Andor,** Versuche über die bei der Fäulnis von l-Asparaginsäure entstehenden Abbaustufen. Eine neue Methode zum Nachweis von β-Alanin. 112
—, **Fromme, Georg** und **Hirsch, Paul,** Die Bildung von γ-Aminobuttersäure an d-Glutaminsäure unter dem Einfluß von Mikroorganismen. 112
Anonym, Une Bactérie du filage. 129
—, Kennerknechts abnehmbarer Flaschenverschluß. 194
—, Das Kristall-Milchfilter. 194
—, Milcherhitzung und Kannendämpfung. 194
—, Note sur la préparation du Manioc amer (Manihot utilissima, Pohl) dans la région de Katalo-Kombe (Congo belge). 161
—, Das neue Steroverfahren zur Veredelung von Milch und Milcherzeugnissen. 179
Allemann und **Müller,** Das Vorbrechen und das Scheiden der Käsereimolke. 146
Arkwright, J. A., Natural variation of B. acidi lactici with respect to the production of gas from Carbohydrates. 142
Audouard, L'impureté du sel alimentaire. 166

Backhaus, Über Kindermilchbereitung nach 20-jähriger Erfahrung. 195
Bainier, G. et **Sartory, A.,** Étude biologique et morphologique de certains Aspergillus. 114
— —, Étude de deux Penicillium nouveaux producteurs de pigment. 115
— —, Étude d'un Penicillium nouveau, Penicillium Herquei n. sp. 115
— —, Nouvelles recherches sur les Citromyces. Étude de six Citromyces nouveaux. 165
Bassalik, K., Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien. I. Mitteilung. 154
Beauverie, J., Les méthodes de la biométrique appliquées à l'étude des levures. 175
Beer s. **Eichloff.**
Beijerinck, M., Über die Selbstgärung bei der Alkoholhefe. 124
Bekaert, E., L'habitat du ferment de la tourne. 129
Berg, Hugo, Über die Bazillen der Yoghurt-Milch. 143
Berg, W. N. s. **Rogers, L. A.**
Bertin Sans et **Gaujoux,** Les catalases du lait de vache; leur signification au point de vue de la valeur hygiénique du lait. 141
Bizzell, James A. s. **Lyon T. Lyttleton.**
Blochwitz, Adalbert, Vergleichende Physiologie der Gattung Aspergillus (Orig.). 497
Boeseken, J. et **Waterman, H.,** Sur l'action de quelques derivés du benzène sur le développement de Penicillium glaucum. 187
Bokorny, Th., Einwirkung von Eisen-, Mangan-, Zink- und Kadmiumvitriol auf die Vermehrung der Hefe. 121
—, Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Gärkraft. 122
Bornand, M., Influence des métaux sur le développement de l'Aspergillus niger cultivé sur liquide de Raulin. (Orig.) 488
Boullanger, E. et **Dugardin, M.,** Mécanisme de l'action fertilisante du soufre. 160
Bradley, H. C., Lactose of the Mammary Gland. 120
Bredemann, Untersuchungen über das Bakterienimpfpräparat „Heyls concentrated Nitrogen Producer" (Composite Farmogerm). 157
Broquin-Lacombe, A., Sur un pigment bleu du Bacillus mesentericus niger. 113
Brown, Percy Edgar, Bacteriological studies of field soils. III. The effects of barnyard manure. (Orig.) 523
—, Methods for the bacteriological examination of soils. (Orig.) 61
Buchner, Eduard und **Langheld, Kurt,** Notiz zur alkoholischen Gärung des Zuckers. 166
Buchner, P., Studien an intrazellularen Symbionten. I. Die intrazellularen Symbionten der Hemipteren. 169
Bürger, O., Kann Ozon zu Desinfektionszwecken in der Brauerei verwendet werden? 203

Cassel, Henry s. **Euler, Hans.**
Chalot, C., Contribution à l'étude sur la fermentation du Cacao. 161
Ciaccia, M. s. **Rossi, G.**
Ciocalten, L'épandage agricole et les Microbes. 156
Clement, H., Action de l'argent sur la végétation de l'Aspergillus niger. 187
Codur, J. et **Thiery, G.,** Aspergillus et argent métallique. 186
Collard, Bo y, Comment doit être organisée l'inspection du lait spécialement dans les grandes villes. 131
— et **Lust, E.,** Désidérata formulés pour la fourniture du lait aux gouttes de lait, aux consultations de puériculture, aux crèches, aux ponponnières et autres oeuvres de protection du premier âge. 131
Cunningham, Andrew and **Löhnis, F.,** Studies on soil protozoa I. The growth of Protozoa on various media and the effect of heat on active and encysted forms. (Orig.) 596
Czepa, Alois, Organismenleuchten und Zweckmäßigkeit. 112

Davis, Brooke J. s. **Rogers, L. A.**
Denkschrift des Deutschen Milchwirtschaftlichen Vereins über die Errichtung einer wissenschaftlichen Anstalt für die deutsche Milchwirtschaft. 195
Densch, Zur Frage der schädlichen Wirkung zu starker Kalkgaben auf Hochmoor. 159
Devarda und **Weich,** Die Morressche „Alizarolprobe" zur Prüfung der Haltbarkeit der Milch. 183
Dox, W. Arthur, und **Ray, E. Neidig,** Enzymatische Spaltung von Hippursäure durch Schimmelpilze. 118
Dreyer, G., Beiträge zur Chemie der Hefe. I. Über die Natur der Zellmembran. II. Untersuchungen über das Hefeneiweiß. 123
Dugardin, M. s. **Boullanger, E.**

Edwards, S. F., Fruity or sweet flavor in Cheddar cheese. (Orig.) 449
Ehrlich, F., Über die Hydrolyse des Hefeeiweiß. 204
Eichloff und **Beer,** Milchkonservierungsmittel „Doux". 196
Eijkman, C., Die Gärungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung. (Orig.) 75
Euler, Hans und **Cassel, Henry,** Über Katalysatoren der alkoholischen Gärung. Vorläuf. Mitteil. 127
— und **Johansson, David,** Über die Reaktionsphasen der alkoholischen Gärung. 175
— —, Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme. VIII. Über die gleichzeitige Veränderung des Gehalts an Invertase und an Gärungsenzymen in der lebenden Hefe. 117
Ernst, Wilhelm, Grundriß der Milchhygiene für Tierärzte. 137

Farmer, Ch. J. s. **Kendall, A. J.**
Fodor, Andor s. **Abderhalden, Emil.**
Fred, Edwin Broun, A study of the formation of nitrates in various types of Virginia soil. (Orig.) 455
Freund, W., „Taette", die Sauermilch der Skandinavier. 143
Frick, Joseph, Untersuchungen über den Einfluß der Leukocytenzahl und der Entzündungsprodukte auf die Reaktion der Milch. 180
Frings, H., Essigbakterien-Dauerkulturen mittels des Fringsschen Dauerkultur-Kolbens. 203
Froloff Bagreief s. **Lubimenko.**
Fromme, Bakteriologische Trinkwasseruntersuchungen und Colibazillen. 175
Fromme, Georg s. **Abderhalden, Emil.**
Frost, G., Einiges über die Gewinnung und Behandlung roher Säuglingsmilch. 138
—, Milchwirtschaftliche Tagesfragen. 137
Frouin, A., Le milieu de culture d'acides aminés complets pour microorganismes. 174
Fuhrmann, F., Vorlesungen über technische Mykologie. 107

Gainey, P. L., The effect of toluol and CS_2 upon the microflora and fauna of the soil. 158
—, Effect of CS_2 and Toluol upon nitrification. (Orig.) 584
Gaujoux s. **Bertin Sans.**
Genoud, E. G. s. **Lindner, P.**
Gerlach, M., Über die Wirkung einer Durchmischung des leichteren Bodens mit Moor, Mergel, Ton und Stroh. 153
Glenk, K. s. **König, J.**
Goy, S., Über einige amerikanische Milchpulver. 135
Greaves, J. E., Some factors influencing ammonification and nitrification in soils. (Orig.) 542
Greig-Smith, R., Contributions to our knowledge of soil-fertility. No. 6. The inactivity of soil-protozoa. 152
Grouven, O. s. **Lindner, P.**
Grüß, Biologie und Kapillaranalyse bei Enzymen. 116
Guilliermond, A., Les Levures. Préface de E. Roux. 128

Hairi, Ekrem, Über den Einfluß der organischen Substanzen auf die Desinfektion des Trinkwassers. 192
Hanauer, Kommunale Milchversorgung. 138

Hasenhänner, J. s. **König, J.**
Henningson, B., Eine neue Methode zur Beurteilung der fäkalen Verunreinigung eines Wassers, gegründet auf die Veränderlichkeit des Gasbildungsvermögens von B. coli. 177
Hering, F., Über hygienisch einwandsfreie Milchaufbereitung. 196
Herke, A., Impfversuche mit Knöllchenbakterien an Lupinen und Serradella. 156
Hesselink van Suchtelen, Methode zur Gewinnung der natürlichen Bodenlösung. 198
Hilliard, C. M. s. **Stowell, E. C.**
Hinze, G., Beiträge zur Kenntnis der farblosen Schwefelbakterien. 160
Hirsch, Paul s. **Abderhalden, Emil.**
Hoffmann, K. s. **Schönfeld, F.**
Hübbenet, E. s. **Kostytschew, S.**
Hutchinson, C. M., Studies in bacteriological analysis of Indian soils. 154

Jannin, L. et **Vernier, P.,** A propos des genres Zymonema et Mycoderma. 125
Javillier, Influence du zinc sur la consommation par l'Aspergillus niger des aliments hydrocarbonés, azotés et minéraux. 186
Jensen, Hj. et **Ott de Vries,** Untersuchungen über Tabak aus Vorstenlanden. Bericht über das Jahr 1911. [Onderzoekingen over tobak der Vorstenlanden. Verslag over h. j. 1911.] 169
Jensen, Orla, Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft. 139
International **Catalogue** of Scientific Literature Botany. 110
Johansson, David s. **Euler, Hans.**
Issatschenko, B. L., Einige Daten über die Bakterien des Eisbodens. [Nekotorija dannija o bakterijach „merzloti".] 151
—, Über die Ablagerung von schwefeligem Eisen in den Bakterien. [Ob otloženi sěristago želězna vnutr bakteriy.] 113

Keith, S. C., Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. A preliminary communication. 150
Kellerman, K. F., McBeth, J. G. Scales, F. M. and **Smith, N. R.,** Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria. (Orig.) 502
Kendall, A. J. and **Farmer, Ch. J.,** Studies in Bacterial metabolism. VII. 111
Kiesel, Sur l'action de divers sels acides sur le développement de l'Aspergillus niger. 186
Klebahn, H., Grundzüge der allgemeinen Phytopathologie. 171
Klose, Versuche betreffend die Herstellung von Kamembert-Käsen nach dem Mazéschen Verfahren. 147
Knudson, Lewis, Tannic acid fermentation. I and II. 166
Köck, G., Die wichtigsten Kartoffelkrankheiten und ihre Erkennung auf dem Felde 172
König, J., Hasenbäumer, J. und **Glenk, K.,** Über die Anwendung der Dialyse und die Bestimmung der Oxydationskraft für die Beurteilung des Bodens. 184
Kostytschew, S., Über Alkoholgärung. IV. Mitteilung. Über Zuckerspaltung durch Dauerhefe in Gegenwart von Zinkchlorid von S. Kostytschew und A. Scheloumoff. 124
— und **Hübbenet, E.,** Zur Frage der Reduktion von Acetaldehyd durch Hefesaft. 125
— — und **Scheloumoff, A.,** Über die Bildung von Acetaldehyd bei der anaeroben Atmung der Pappelblüten. 113
Krage s. **Zwick.**
Krüger, W. und **Wimmer, G.,** Gefäßversuche über die Wirkung verschiedener Stickstoffdünger bei Zuckerrüben. 155
Kühl, H., Über eine Käsevergiftung, verursacht durch eine mit Bact. lactis aërogenes übereinstimmende Bakterie. 144
—, Die Milchsäurelangstäbchen. 141
—, Untersuchungen über die Konservierung der Butter (speziell für Tropenversand). 196
Küster, Ernst, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen für den Gebrauch in zoologischen, botanischen, medizinischen und landwirtschaftlichen Laboratorien. 174

Laifle, X., Zur Theorie und Praxis der Formaldehyd-Vakuum-Desinfektion. 198
Lane-Claypon, Janet E., The biological properties of milk, both of the human Species and of cows, considered in special relation to the feeding of infants. 138
Langheld, Kurt s. **Buchner, Eduard.**
Lasseur, Ph., Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses Bactéries. 188
Lauterborn, Robert, Die biologische Selbstreinigung unserer Gewässer. 188
Lebedew, A. von, Über den Mechanismus der alkoholischen Gärung. 123
—, 1. Über die Veresterung von Dioxyaceton mit Phosphaten. 2. Über Alkoholgärung. 121
Linde, P., Zur Kenntnis von Cladothrix dichotoma Cohn. (Orig.) 369
Lindner, P. und **Grouven, O.,** Inwieweit findet eine Beeinflussung der Desinfektionswirkung verschiedener Antiseptika durch gesteigerte Hefemengen statt? 200
— und **Genoud, E. G.,** Zur Charakteristik der Willia belgica und einiger Hefen aus belgischem Lambicbier. 202

— und **Schmidt, O.,** Die Widerstandsfähigkeit eines bei verschiedenen Temperaturen herangezüchteten Hefenmaterials gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln und der Einfluß der Temperatur während der Einwirkung der letzteren. 201

Lipman, Ch. B., The distribution and activities of bacteria in soils of the acid region. 151

Lobeck, O., Neues Verfahren zum Entkeimen von Milch. 195

Löhnis, F. s. **Cunningham, Andrew.**

Lubimenko, et **Froloff-Bagreief,** Influence de la lumière sur la fermentation du mout de raisin. 149

Lust, E. s. **Collard Bovy.**

Lutz, L., Sur la présence dans le Gryomitra gigas et la Disciotis perlata de tyrosinase et d'un chromogène. 121

Lyon, T., Lyttleton and **Bizzell, James A.,** Water-soluble matter in soils sterilized and reinoculated. 198

McBeth, J. G. s. a. **Kellerman, K. F.**

— and **Scales, F. M.,** The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. 167

Man, J. G. de, Anguillula Silusiae n. sp., eine neue, in den sogenannten „Bierfilzen" lebende Art der Gattung Anguillula Ehrb. (Orig.) 74

Mason, G. H. s. **Percival, J.**

Mayer, Gg., Die Anforderungen an Fleischbüchsenkonserven. 162

Mayer, Paul, Zuckerfreie Gärung bei Stereoisomeren. 118

Meinert, C., Hygienisch einwandfreie Milch. 131

Melhus, J. E., The perennial mycelium of Phytophthora infestans. (Orig.) 482

Metzger, Karl, Untersuchungen über die Alkoholprobe bei Milch von kranken Kühen. 181

Meyer, A., Notiz über das Aussehen der Bakterien im Ultramikroskop. 110

Mickel, H., Einiges über Leguminosenimpfung. 156

Moreau, F., Sur les zones concentriques que forment dans les cultures les spores de Penicillium glaucum Lk. 116

Morse, John Lovett, Sterilization boiling and pasteurization of milk. 193

Moufang, E., Über eine katalytische Wirkung toter Hefezellen auf die Gärung. 202

Müller s. **Allemann.**

Münter, F., Über Stickstoffumsetzungen einiger Aktinomyceten. II. Mitteilung. (Orig.) 561

— und **Robson, W. P.,** Über den Einfluß der Böden und des Wassergehaltes auf die Stickstoffumsetzungen. (Orig.) 419

Mütterlein, C., Studien über die Zersetzung der Zellulose im Dünger und Boden. 167

Nagel, C., Furfurol, seine Entstehung, sein Verbleib und Nachweis, besonders in bezug auf den Brauereibetrieb. 202

Náray, Andor, Ein neues Bacterium, das in der Milch einen gelben Farbstoff hervorbringt. [Sárga festanyagot képzö ùj baktérium a tejben.] 141

Nègre, L., Bactéries thermophiles des eaux de Fignig (Algérie). 149

—, Bactéries thermophiles des sables du Sahara. 152

Neuberg, Carl, Weitere Untersuchungen über die biochemische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure nebst Bemerkungen über die Entstehung der verschiedenen Milchsäuren in der Natur. 121

— und **Rosenthal, P.,** Über zuckerfreie Hefegärungen. XI. Mitteilung. Weiteres zur Kenntnis der Karboxylase. 125

Neville, Allen, Linseed mucilage. 165

Nicolae, O., Fermentierte Milch. 143

Oker-Blom, M., Über die keimtötende Wirkung des ultravioletten Lichtes in klarem, getrübtem und gefärbtem Wasser. 189

—, Über die Wirkungsart des ultravioletten Lichtes auf Bakterien. 185

Ott de Vries s. **Jensen, Hj.**

Owen, W. L., The occurrence of Saccharomyces zopfii in cane syrups and variation in its resistance to high temperatures when grown in solutions of varying densities. (Orig.) 468

Pallmann, Karl, Die Milch-Labhemmprobe. 181

Panzer, Theodor, Einwirkung von Ammoniakgas auf Diastase. III. 119

—, Einwirkung von Ammoniakgas auf Invertase. IV. Mitteilung. 118

—, Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas auf Diastase. V. Mitteilung. 119

—, Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas auf Invertase. VI. Mitteilung. 119

—, Einwirkung von Stickoxyd auf Diastase. VII. Mitteilung. 119

—, Einwirkung von Stickoxyd auf Invertase. VIII. Mitteilung. 119

Paraschtschuk, S., Biologische Untersuchungsmethode für die Güte der Milch. 132

Percival, J. and **Mason, G. H.,** The microflora of Stilton-cheese. 145

Petri, L., Die Struktur des Verdauungsrohres bei Dacus-Arten in Beziehung zu den symbiontischen Mikroorganismen. (Orig.) 360

Potteiger, C. R. s. **Rogers, L. A.**

Pringsheim, H., Zur Totalhydrolyse des Hefeeiweiß. 203

Ray, E. Neidig s. **Dox, W. Arthur.**

Reed, H., Die enzymatische Kraft gewisser Pflanzendiastasen. 120

Rettger, Leo F., The bacteriology of the hen's egg, with special reference to its freedom from microbic invasion. (Orig.) 611

Revis, Cecil, Further studies on variation in physiological activity in B. coli. (Orig.) 394

Richet, Ch., Une race de ferment lactique arsénicophile (accoutumée aux fortes doses d'arsénic). 120

Rieckhoff, P., Einiges über die Gewinnung und Behandlung roher Säuglingsmilch. 132

Riehm, E., Getreidekrankheiten und Getreideschädlinge. 1912. (Orig.) 81

Ritter, Über die lediglich chemische Ursache sowie das nähere Wesen der schädigenden Wirkung starker Kalkungen auf Hochmoorboden. 158

Robson, W. P. s. **Münter, F.**

Rochaix, A., Nouveau milieu végétal pour cultures microbiennes (Agar au jus de carotte). 174

Roger, H., Influence de la bile sur les fermentations microbiennes. I. Fermentation de l'amidon. II. Fermentation du glycogène. III. Fermentation du glucose. 118

Rogers, L. A., Berg, W. N., Potteiger, C. R. and **Davis, B. J.,** Factors influencing the change in flavor in storage butter. 149

— and **Davis Brooke, J.,** Methods of classifying the lactic-acid bacteria. 141

Rosam, A., Eine einfache Methode zur Beurteilung des Gärungsvermögens verschiedener Futterstoffe der Milch und des Galaktaseenzyms der Milch. 163

—, Eine einfache mikroskopische Beurteilung des Gehalts der Milch an Mikroorganismen. 140

Rosenau, M. J., The milk question. 132

Rosenthal, P. s. **Neuberg, C.**

Rossi, G. e **Ciaccia, M.,** Novo contributo allo studio della decomposizione dei vegetali. 161

— —, Studii critici e sperimentali sui fermenti pectici anaerobici. 161

Rubner, Max, Über die Nahrungsaufnahme bei der Hefezelle. 128

Rullmann, W., Vorläufige Mitteilung über Römers Arbeit: „Zur Schardinger-Reaktion der Kuhmilch". 180

Scales, F. M. s. **McBeth, J. G.** und **Kellerman, K. F.**

Scheel, Hartwig, Eignet sich die Schardinger-Reaktion zur Feststellung des Frischmilchendseins der Kühe? 180

Scheloumoff, A. s. **Kostytschew, S.**

Schiemann, E., Mutation bei Aspergillus niger van Tieghem. 114

Schlesinger, M. J. s. **Stowell, E. C.**

Schmid, Die westpreußische Käserei im Frühjahr. 147

Schmid, L., Lab und Sauer in der Schweizerkäserei. 148

Schmidt, O. s. **Lindner, P.**

Schneider, E., Schimmelpilze in Leinkuchen. 164

Schönfeld, F. und **Hoffmann, K.,** Ozon als Desinfektionsmittel in der Brauerei. 201

Shibata, K., Untersuchungen über lockere Bindung von Sauerstoff in gewissen farbstoffbildenden Bakterien und Pilzen. 111

Simon, Was ist bei Ausführung einer Hülsenfrucht-Impfung besonders zu beachten? 156

Smith, N. K. s. **Kellerman, K. F.**

Söhngen, N. L., Einfluß einiger Kolloide auf die Alkoholgärung. 125

Sommerfeldt, Sigurd, Beitrag zur Bestimmung des Keimgehaltes in der Milch. 182

Sprinkmeyer, Fr., Versuche über die Einwirkung von Saugflaschen mit Rohr auf den Keimgehalt der daraus abgesaugten Milch. 135

Steng, H., Die Milch brünstiger Kühe. 133

Stowell, E. C., Hilliard, C. M. and **Schlesinger, M. J.,** A statistical study of the Streptococci from milk and from the human throat. 133

Sani, G., Azione del fosfato monocalcico sulla conservazione dei foraggi verdi. 163

Sartory, A. s. a. **Bainier, G.**

—, Sur la présence d'Aspergillus fumigatus Fresenius sur des cigares. 169

— et **Sydow, H.,** Étude biologique et morphologique d'un Aspergillus nouveau, A. Sartory i Syd. n. sp. 114

Sauton, R., Sur la sporulation de l'Aspergillus fumigatus. 114

Sawamura, S., On Bacillus Natto. 114

Sawjalow, W., Über die Schwefelwasserstoffgärung im schwarzen Heilschlamme. (Orig.) 440

Teichert, K., Über bankrote Käse. 147

Theißen, F., Trichopeltaceae n. fam. Hemisphaerialum. (Orig.) 625

Thiersch, Über die verschiedenen Verfahren zur Reinigung von Abwässern. 193

Thiry, G. s. **Codur, J.**

Thomas, J., Bosley s. **Weinzierl, John.**

Ulmann, Hermann, Untersuchungen von Milch euterkranker Kühe auf ihren Enzymgehalt. 182

Ursprung, A., Über das exzentrische Dickenwachstum an Wurzelkrümmungen und über die Erklärungsversuche des exzentrischen Dickenwachstums. 172

Vanderstricht, A. s. **Vandevelde, A. J. J.**
Van de Velde, H., L'approvisionnement de lait à New York. 135
Vandevelde, A. J. J. und **Vanderstricht, A.,** Über Invertasereaktion bei gemischten Hefekulturen. 129
Vernier, P. s. **Jannin, L.**
Viehoever, Arno, Botanische Untersuchung harnstoffspaltender Bakterien mit besonderer Berücksichtigung der speziesdiagnostisch verwertbaren Merkmale und des Vermögens der Harnstoffspaltung. (Orig.) 209
Voges, Ernst, Zur Geschichte und Entstehung des Obstbaumkrebses. (Orig.) 641
Vollrath, Carl, Untersuchungen über den Einfluß äußerer und innerer Krankheiten auf den Enzymgehalt der Kuhmilch. 183
Vouk, V., Die Lebensgemeinschaften der Bakterien mit einigen höheren und niederen Pflanzen. 111

Waterman, H. s. **Boeseken, J.**
Wehmer, C., Pilzverzuckerung und Amyloverfahren. 164
—, Selbstvergiftung in Penicilliumkulturen als Folge der Stickstoffernährung. 186
—, Über Variabilität und Spezies-Bestimmung. 115
—, Über Zitronensäuregärung. 164
Weich s. **Devarda.**
Weinzirl, John and **Thomas, J. Bosley,** A comparison between the sand filtration method and the bubbling method for enumerating bacteria in the air. 188
Weyland, H., Zur Ernährungsphysiologie mykotropher Pflanzen. 170
Whipple, George H., The 37° bacterial count. 174
Wiegert, E., Zur Bereitung und Anwendung von Yoghurtmilch. 143
Will, H., Beiträge zur Kenntnis der sogenannten schwarzen Hefen. (Orig.) 1
—, Beobachtungen an den Kristallen in Bierhefen und in Faßgelägern. 126
—, Einfluß der Konzentration der Würze auf die Entwicklung von Organismen bei der biologischen Untersuchung von Brauwasser. 130
—, Saccharomyces anamensis, die Hefe des neueren Amyloverfahrens. (Orig.) 26
Wimmer, G. s. **Krüger, W.**
Wojtkiewicz, A., Untersuchung der Moskauer Marktmilch. (Orig.) 53
Wolff, A., Zur Frage nach den Beziehungen zwischen Bakterienflora der Milch und der Weide. (Orig.) 411

Zwick und **Krage,** Über die Ausscheidung von Abortusbazillen mit der Milch infizierter Tiere. 136

II. Namen- und Sachverzeichnis.

Abortusbazillen, Vorkommen in Milch. 136
Abwässer, Reinigungsverfahren. 193
Acetaldehyd, Nachweis bei alkoholischer Gärung durch Natriumphosphat. 166
—, Reduktion durch Hefesaft. 125
—, Zwischenprodukt bei Alkoholgärung. 124
Ackersenf, Keimfähigkeit unreif geernteter Samen. 87
—, Keimung, Bedeutung von Temperaturschwankungen. 86
—, —, — des Umlagerns der Samen. 86
—, Keimungsbedingungen. 86
Acremonium, Zugehörigkeit zu Ophiobolus herpotrichus. 663
Acrostalagmus cinnabarinus, Sauerstoffspeicherung. 112
Actinomyces albus, Ammoniakbildung. 562
— —, Ammoniakzersetzung. 567
— —, Nitratassimilation. 576
Actinomyces chromogenes, Ammoniakbildung. 562
— —, Ammoniakzersetzung. 567
— —, Nitratassimilation. 576
— odorifer, Ammoniakbildung. 561
— —, Ammoniakzersetzung. 567
— —, Nitratassimilation. 576
— pelogenes, Schwefelwasserstoffgärung. 442
— —, Unterschied von Microspira desulfuricans. 444
Ätzkali, Wirkung auf Zymase. 122
Aktinomyceten, Stickstoffumsetzungen. 561
—, Wirkung auf die Stickstoffbindung durch Azotobacter. 582
Alanin, β-, Nachweis, neue Methode. 112
Alizarolprobe, Wert zum Nachweis der Haltbarkeit der Milch. 183
Alkoholprobe der Milch, Beziehung zu Krankheiten der Kühe. 181
Alternaria solani, Erreger der Dürrfleckenkrankheit der Kartoffel. 172

Aluminium, Wirkung auf Hefe. 122
Aluminiumoxyd, kolloidales, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Ameisensäure, Wirkung auf Zymase. 122
Amidon, Fermentation, Wirkung von Rindsgalle. 118
Aminobuttersäure, γ-, Bildung aus d-Glutaminsäure durch Bakterien. 112
Ammoniak, Bildung durch Aktinomyceten. 561
—, — im Boden, Wirkung von Arsen. 547
—, — — —, — — Arsentrisulfit. 548
—, — — —, — — Bleiarsenat. 548
—. — — —, — verschiedener Düngermengen. 529
—, — — —, — von Parisergrün. 548
—, — — —, — — Schwefeldüngung. 160
—, — — —, — — Zinkarsenat. 548
—, Wirkung auf Zymase. 122
—, Zersetzung durch Aktinomyceten. 567
Ammoniakgas, Schädigung von Invertase. 118
—, Wirkung auf Diastase. 119
Ammoniumformiat, Wirkung auf Alkoholgärung. 128
Ammoniumsulfat, Wirkung auf die Nitratbildung im Boden. 460
Amoeba terricola, Entwicklung bei verschiedenen Temperaturen. 603
Amoeben, Cysten, Wirkung hoher Temperaturen. 608
—, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
—, — — Giltaylösung. 599
—, — — Mannitlösung. 599
—, — — Omelianskylösung. 600
—, — — Winogradsky-Omeliansky-Lösung. 598
Amylobakterien, anaërobe, Fehlen pektinlösender Eigenschaften. 161
Amyloverfahren. 164
Anguillula silusiae n. sp., Diagnose. 74
Anthothrips aculeatus, Schädling vom Roggen. 100
Antiavit, Bekämpfungsversuch gegen Weizensteinbrand. 91
—, Wert als Saatenschutzmittel. 102
Antiformin, Widerstandsfähigkeit von Hefe 201
Antimycel, Bekämpfungsversuche gegen Weizensteinbrand. 91
Antiseptica, Desinfektionswirkung, Beeinflussung durch Hefe. 200
Apera spica venti s. a. Windhalm.
— — —, Bedeutung des Lichtes für die Keimung. 87
— — —, Keimungsbedingungen. 87
Apfelbaum, Krebs, Anatomie. 650
Arsen, Anpassung von Milchferment. 120
—, Vorkommen im Boden. 542. 546
—, Wirkung auf die Ammoniakbildung im Boden. 547
—, — — Nitratbildung im Boden. 551
Arsentrisulfid, Wirkung auf die Ammoniakbildung im Boden. 548
Arsentrisulfid, Wirkung auf die Nitratbildung im Boden. 552
Ascobacterium luteum, Erreger des Fadenziehens des Bieres. 129
Asparaginsäure, l-, Fäulnis. 112
Aspergillus, amylolytische Enzyme. 499
—, Farbstoffbildung. 501
—, Perithecienbildung, Bedeutung der Temperatur. 501
—, vergleichend Physiologie. 497
— flavus, Wirkung von Silber auf das Wachstum. 186
— —, Zellulosezerstörung. 167
— fumigatus, Konidienbildung, Bedingungen. 114
— —, Vorkommen auf Zigarren. 169
— —, Wirkung von Silber auf das Wachstum. 186
— —, Zellulosezerstörung. 167
— glaucus, Fehlen von Diastase. 499
— nidulans, Zellulosezerstörung. 167
— niger, Entwicklung, oligodynamische Wirkung verschiedener Metalle. 490
— —, Oxalsäurebildung. 498
— —, Tannasegehalt, Wirkung des Gerbsäuregehaltes der Nährlösung. 167
— —, Mutation. 114
— —, Wirkung von Gerbsäure. 166
— —, — — Salzen auf das Wachstum. 186
— —, — — Silber auf das Wachstum. 187
— —, — — Zink auf das Wachstum. 186
— sartoryi n. sp., Biologie und Morphologie. 114
— scheelei var. scheelei, Fluorescens. 114
— — — —, Koagulation von Milch. 114
— wentii, Empfindlichkeit gegen Säure. 498
Aspidium, Vorkommen von Harnstoff. 170
Asterella subcuticulosa, synonym mit Brefeldiella brasiliensis. 637
Asterina labecula, synonym mit Trichopeltina labecula. 630
— magnifica, synonym mit Pycnocarpon magnificum. 639
— pulla, Vorkommen auf Panax arboreum. 635
— reptans, synonym mit Trichopeltis (?) reptans. 634
— subcuticulosa, synonym mit Brefeldiella brasiliensis. 637
Asteroma labecula, synonym mit Trichopeltina labecula. 630
Auswachsen des Getreides, Vorbeugungsmaßregeln. 33
Avena fatua s. a. Flughafer.
— —, Keimungsbedingungen. 87
— —, Unterschied von A. sativa. 87
— sativa, Unterschied von A. fatua. 87
Azara serrata, Vorkommen von Trichopeltina labecula. 630
Azotobacter, Stickstoffbindung, Wirkung von Aktinomyceten. 582

Azotogen, Impfversuche. 156

Bacillus acidi lactici, Gasbildung, Wirkung von Malachitgrün und Brillantgrün. 402
— — —, Vorkommen im Stilton-Käse. 146
— — —, — — Urin. 142
— alcaligenes, Alkali- und Säurebildung. 111
— amylobacter, Vorkommen in Eiern. 618
— aurococcus, Wirkung niedriger Temperaturen. 150
— aurogenus n. sp., Zellulosezerstörung. 505
— — var. albus n. var., Zellulosezerstörung. 506
— biazoteus n. sp., Zellulosezerstörung. 506
— bifidus, Vorkommen im Darm. 142
— bulgaricus, Vorkommen im Yoghurt. 143
— caesius n. sp., Zellulosezerstörung. 506
— cellaseus n. sp., Zellulosezerstörung. 508
— coli, Alkali- und Säurebildung. 111
— —, Gasbildung, Wirkung von Malachitgrün und Brillantgrün. 398
— —, Vorkommen in Eiern. 617
— —, Wirkung niedriger Temperaturen. 150
— — communis, Wirkung ultravioletter Strahlen. 191
— cytaseus var. zonalis n. var., Zellulosezerstörung. 511
— diphtheriae, Vorkommen in Eiern. 617
— dysenteriae, Infektionsversuche mit Bohnen. 156
— extorquens n. sp., Silikatzersetzung. 155
— faecalis alcaligenes, Vorkommen in Eiern. 618
— fluorescens, Vorkommen in Eiern. 617
— —, Wirkung niederiger Temperaturen. 150
— — non liquefaciens, Vorkommen in Eiern. 618
— galbus n. sp., Zellulosezerstörung. 509
— gelidus n. sp., Zellulosezerstörung. 510
— lactis aerogenes, Widerstandsfähigkeit gegen Malachitgrün und Brillantgrün. 404
— lactorubefaciens, Vorkommen an Gras. 413
— megatherium, Farbstoffbildung. 188
— —, Wirkung niedriger Temperaturen. 150
— mesentericus, Farbstoffbildung. 188
— —, Vorkommen in Eiern. 617
— — fuscus, Farbstoffbildung. 188
— — niger, Farbstoffbildung. 113
— — ruber, Farbstoffbildung. 188
— — vulgatus, Farbstoffbildung. 188
— mucosus, Vorkommen in Eiern. 617
— mycoides, Vorkommen an Gras. 412
Bacillus mycoides, Vorkommen in Milch. 412
— natto, Vorkommen in Natto. 114
— paratyphi, Wirkung ultravioletter Strahlen. 191
— paratyphus, Alkali- und Säurebildung. 111
— pasteuri, Identität mit Bacillus probatus. 209
— peptonificans, Wirkung ultravioletter Strahlen. 191
— peptonis XII, Farbstoffbildung. 188
— phytophthorus, Erreger der Schwarzbeinigkeit der Kartoffel. 172
— probatus n. sp., Chitinnachweis. 238
— — — —, Entwicklung, Wirkung von Säure und Alkali. 215
— — — —, Enzyme und Stoffwechselprodukte. 268
— — — —, Geißelfärbung. 234
— — — —, Harnstoffspaltung. 282
— — — —, Morphologie. 225
— — — —, Sporen, Widerstandsfähigkeit gegen Hitze und Gift. 264
— — — —, Sporenbildung, Wirkung von Alkali. 225
— — — —, Sporenkeimung, Bedeutung der Temperatur. 260
— — — —, Vorkommen im Boden. 213
— — — —, Wachstum auf verschiedenen Nährböden. 244
— prodigiosus, Vorkommen in Eiern. 618
— proteus, Alkali- und Säurebildung. 111
— —, Vorkommen in Eiern. 617
— —, Wirkung niedriger Temperaturen. 150
— pusilus n. sp., Zellulosezerstörung. 512
— pyocyaneus, Infektionsversuche mit Bohnen. 156
— —, Vorkommen in Eiern. 617
— ramosus, Vorkommen in Eiern. 617
— rossicus var. castaneus n. var., Zellulosezerstörung. 508
— subalbus n. sp., Zellulosezerstörung. 512
— — var. batatatis n. var., Zellulosezerstörung. 513
— subtilis, Farbstoffbildung. 188
— —, Vorkommen in Milch. 411
— —, Wirkung niedriger Temperaturen. 150
— termo, Vorkommen in Eiern. 618
— typhi, Infektionsversuche mit Bohnen. 156
— typhosus, Alkali- und Säurebildung. 111
— vulgatus, Farbstoffbildung. 188
— violaceum, Vorkommen in Eiern. 618
Bacterium acidulum n. sp., Zellulosezerstörung. 513
— aerogenes, Vorkommen an Gras. 411
— —, — in Milch. 411
— chromoflavum n. sp., Vorkommen in Milch. 141
— coli, Bedeutung für Trinkwasseruntersuchung. 175

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Bacterium coli, Gasbildung, Bedeutung für Wasseruntersuchung. 178
— —, Vorkommen an Gras. 411
— —, — in Milch. 411
— erythrogenes, Vorkommen in Milch. 411
— fluorescens, Vorkommen in Milch. 413
— fulvum, Vorkommen an Gras. 411
— lactis aerogenes, Vergiftung von Käse. 144
— mali, Erreger des Obstbaumkrebses. 644
— pullorum, Vorkommen in Eiern. 612
— trifolii, Erreger vom bitteren Geschmack der Milch. 414
— —, Vorkommen an Gras. 418
— udum n. sp., Zellulosezerstörung. 514
— zopfii, Vorkommen in Milch. 413
Bakterien, Ablagerung von schwefeligem Eisen. 113
—, Alkali- und Säurebildung. 111
—, Ammoniakbildung im Boden, Wirkung von Arsen. 547
—, — — —, — — Arsentrisulfid. 548
—, — — —, — — Bleiarsenat. 548
—, — — —, — verschiedener Düngermengen. 529
—, — — —, — von Parisergrün. 548
—, — — —, — — Zinkarsenat. 548
—, Bildung von γ-Aminobuttersäure aus d-Glutaminsäure. 112
—, Boden-, Inaktivität der Protozoen. 152
—, —, Silikatzersetzung. 155
—, —, Zersetzung von Orthoklas. 155
—, Essig-, Dauerkulturen. 203
—, Farbstoffbildung. 113
—, Gasbildung, Wirkung von Malachitgrün und Brillantgrün. 398
—, Harnstoffspaltung, Untersuchung. 209. 282
—, Knöllchen-, Impfversuche mit Lupinen. 156
—, —, — — Serradella. 156
—, Milchsäure-, Bedeutung für die Darmflora. 142
—, —, Systematik. 141
—, Mohrrübensaft, Nährboden. 174
—, Nitratbildung im Boden, Wirkung von Arsen. 551
—, — — —, — — Arsentrisulfid. 552
—, — — —, — — Bleiarsenat. 552
—, — — —, — verschiedener Düngermengen. 537
—, — — —, — von Parisergrün. 552
—, — — —, — — Zinkarsenat. 552
—, pathogene, Vorkommen in Nährsalzen. 166
—, Sauerstoffspeicherung. 111
—, Schädlinge von Obstbäumen. 644
—, Stoffwechsel. 111
—, Symbiose mit Dacus oleae. 360
—, — — Dacus longistylus. 360
—, — — Pflanzen. 111
—, thermophile, Vorkommen in Sandboden. 152
Bakterien, thermophile, Vorkommen im Wasser. 149
—, Untersuchung mit Ultramikroskop. 110
—, Vergärung von Zuckerarten, Wirkung von Malachitgrün und Brillantgrün. 398. 402
—, Vorkommen im Boden. 213. 505
—, — in dürren Böden. 151
—, — — gefrorenem Boden. 152
—, — — verschiedenen Bodentiefen. 151
—, — — Eiern. 612
—, — — Milch. 141
—, Wirkung auf Leinsamenschleim. 165
— —, der Formaldehyd-Vakuum-Desinfektion. 199
—, — von Kadmiumvitriol. 122
—, — von ultravioletten Strahlen. 185. 189. 191
—, — niedriger Temperaturen. 150
—, — von Zinkvitriol. 121
—, Zellulosezerstörung. 167. 502
—, zellulosezerstörende, Isolierung. 504
—, —, Vorkommen im Boden. 505
—, Zählung, Methodik. 288
Bakteriengehalt des Bodens, Wirkung verschiedener Düngermengen. 527
— — —, — von Schwefelkohlenstoff. 158
— — —, — — Toluol. 158
— der Luft, Bestimmungsmethode. 188
— — Milch, mikroskopische Beurteilung. 140
Balantiophorus elongatus, Entwicklung in Omelianskylösung. 600
Bambusa, Vorkommen von Brefeldiella brasiliensis. 637
Beizempfindlichkeit des Getreides. 83
Benzoe-Derivate, Wirkung auf die Entwicklung von Penicillium glaucum. 187
Bibitkrankheit der Tabakpflanze. 169
Bier, Fadenziehen durch Ascobacterium luteum. 129
—, Umschlagen, Verhütung. 129
Biorisator, Apparat zur Milchentkeimung. 196
Blasenfüße, Schädlinge von Getreide, Bedeutung der Saatzeit. 100
Blattläuse, massenhaftes Auftreten an Getreide. 100
—, Schädlinge der Kartoffel. 172
Blattrollkrankheit der Kartoffel durch Fusarium. 172
Blei, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
Bleiarsenat, Wirkung auf die Ammoniakbildung im Boden. 548
—, — — — Nitratbildung im Boden. 552
Blutkohle, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Blutmehllösung, Entwicklung von Protozoen. 598
Boden, Ammoniakbildung, Wirkung von Arsen. 547
—, —, — — Arsentrisulfid. 548

Boden, Ammoniakbildung, Wirkung von Bleiarsenat. 548
—, —, — verschiedener Düngermengen. 529
—, —, — von Parisergrün. 548
—, —, — — Schwefeldüngung. 160
—, —, — — Zinkarsenat. 548
—, Bakteriengehalt, Wirkung verschiedener Düngermengen. 527
—, —, —von Schwefelkohlenstoff. 158
—, —, — — Toluol. 158
—, bakteriologische Untersuchung. 154
—, — —, Methodik. 61
—, dürrer, Vorkommen von Bakterien. 151
—, Fruchtbarkeit, Bedeutung der Oxydationskraft. 184
—, gefrorener, Vorkommen von Bakterien. 152
—, —, — — Penicillium. 152
—, Hochmoor, Wirkung von Kalkdüngung. 158. 159
—, Kalkmangel, Schädigung von Getreide. 85
—, leichter, Durchmischung mit Mergel, Moor und Ton. 153
—, Nitratbildung, Bedeutung des Wassergehaltes. 154
—, —, Wirkung von Ammoniumsulfat. 460
—, —, — — Arsen. 551
—, —, — — Arsentrisulfid. 552
—, —, — — Bleiarsenat. 552
—, —, — — Bodenart und Feuchtigkeit. 427
—, —, — verschiedener Düngermengen. 537
—, —, — von Kalk. 461
—, —, — von Parisergrün. 552
—, —, — — Sand. 461
—, —, — — Schwefeldüngung. 160
—, —, — — Schwefelkohlenstoff. 584
—, —. — — Temperatur und Feuchtigkeit. 458
—, —, — — Toluol. 584
—, —, — — Zinkarsenat. 552
—, Protozoen, Inaktivität gegenüber Bakterien. 152
—, —, Untersuchung. 596
—, Säureanreicherung, Schädigung von Weizen. 82
—, Salpeterbildung, Wirkung von Bodenart und Feuchtigkeit. 430
—, Stickstoffumsetzung, Bedeutung der Aktinomyceten. 561
—, —, Wirkung von Zucker. 435
—, Stickstoffverluste, Wirkung von Bodenart und Feuchtigkeit. 434
—, Umsetzungen, Bedeutung der Regenwürmer. 154
—, Unkrautsamen, Keimfähigkeitsdauer. 86
—, Unkrautsamengehalt. 85
—, —, Nachweis, Methode. 86
Boden, Vorkommen von Bakterien. 213. 505
—, — — — in verschiedenen Tiefen. 151
—, — — thermophilen Bakterien. 152
—, — — Fusarien. 98
—, — — zellulosezerstörenden Bakterien. 505
—, Wirkung von Strohdüngung. 153
Bodenbakterien s. Bakterien, Boden-.
Bodenlösung, natürliche Gewinnung. 198
Bodo angustatus, Entwicklung in Giltaylösung. 599
Bohne, Infektionsversuche mit Bacillus dysenteriae. 156
—, — — Bacillus pyocyaneus. 156
—, — — Bacillus typhi. 156
Bordeauxbrühe, Herstellung. 91
Brauerei, Ozon Desinfektionsmittel. 201. 203
Brauwasser s. Wasser, Brau-.
Brefeldiella, Diagnose. 637
— brasiliensis, Vorkommen auf Bambusa. 637
— —, — — Olearia argophylla. 637
— subcuticulosa, synonym mit B. brasiliensis. 637
Brillantgrün, Widerstandsfähigkeit von Bacillus lactis aerogenes. 404
—, Wirkung auf die Gasbildung von Bakterien. 398. 402
Butter, Geruch, Veränderung bei der Aufbewahrung durch minimale Eisenmengen. 149
—, Konservierung, Untersuchung. 196

Calonectria, Beziehungen zu Fusarium nivale. 96
Cephalothecium roseum, Zellulosezerstörung. 167
Chinosol, Bekämpfungsmittel gegen Fusarium nivale. 97
Chlor, Desinfektion von Trinkwasser, Bedeutung organischer Substanzen. 192
Chromogen, Vorkommen in Disciotis perlata. 121
—, — — Gyromitra gigas. 121
Chlorops taeniopus, Schädling von Gerste, Bedeutung der Saatzeit. 100
Chlorwasserstoff, Wirkung auf Diastase. 119
—, — — Invertase. 119
Ciliaten, Cysten, Wirkung hoher Temperaturen. 606
Cisar-Räucherungsverfahren, Wert zur Mäusebekämpfung. 103
Citromyces cesiae n. sp., Morphologie und Biologie. 165
— cyaneus n. sp., Morphologie und Biologie. 165
— minutus n. sp., Morphologie und Biologie. 165
— musae n. sp., Morphologie und Biologie. 165
— ramosus n. sp., Morphologie und Biologie. 165

Cladosporium herbarum, Widerstandsfähigkeit gegen niedrige Temperatur. 98
Cladothrix dichotoma, Identität mit Sphaerotilus natans. 370
— —, Kernuntersuchung. 379
— —, Physiologie. 385
— —, Reinkultur. 369
— —, Scheide. 382
— —, Verzweigung. 382
— —, Vorkommen von Volutin. 376
Claviceps purpurea s. a. Mutterkorn.
— —, Konidien, Dauer der Keimfähigkeit. 100
Clusia, Vorkommen von Trichothyrium dubiosum. 635. 636
Colpidium colpoda, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
— —, — — Giltaylösung. 599
— —, — — Mannitlösung. 599
Colpoda cucullus,Entwicklung in Blutmehllösung. 598
— —, — — Omelianskylösung. 600
— steinii, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
— —, — — Omelianskylösung. 600
Coprinus diaphanus, Vorkommen von Harnstoff. 170
— stellaris,Vorkommen von Harnstoff. 170
Corbin, Bekämpfungsversuche gegen Weizensteinbrand. 91
—, Wert als Saatenschutzmittel. 102
Crotaloria retusa, Gründüngung von Tabakpflanzen. 169
Cryptococcus lesieurii, Größenverhältnisse. 175
Cuprocorbin, Bekämpfungsmittel gegen Weizensteinbrand. 91
—, Wert als Saatenschutzmittel. 102
—, Wirkung auf die Keimfähigkeit des Weizens. 91
Cyathomonas truncata, Entwicklung in Blutmehllösung. 598

Dacus caudatus, Verdauungsrohr, Untersuchung. 360
— cucurbitae, Verdauungsrohr, Untersuchung. 360
— ferrugineus, Verdauungsrohr, Untersuchung. 360
— garciniae, Verdauungsrohr, Untersuchung. 360
— longistylus, Verdauungsrohr, Untersuchung. 360
— —, Symbiose mit Bakterien. 360
— oleae, Symbiose mit Bakterien. 360
— zonatus, Verdauungsrohr, Untersuchung. 360
Darm, Vorkommen von Bacillus bifidus. 142
—, — — Enterecoccus. 142
Desfontainia, Vorkommen von Trichopeltina labecula. 630
Desmodium stipulaceum, Gründüngung von Tabakpflanzen. 169
Dextrose, Vergärung durch Saccharomyces anamensis. 41
Diabrotica filicornis, Beziehung zu D. virgifera. 101
— virgifera, Beziehung zu D. filicornis. 101
— —, Schädling vom Mais. 101
Diastase, Wirkung von Ammoniakgas. 119
—, — — Chlorwasserstoff. 119
—, — — Stickoxyd. 119
Dinatriumphosphat, Wirkung auf Zymase. 122
Dioxyaceton, Veresterung mit Phosphaten. 121
Disciotis perlata, Vorkommen von Chromogen. 121
— —, — — Tyrosinase. 121
Distel, Bekämpfungsversuche mit Kainit. 90
Disteltod. 90
Dörrfleckenkrankheit des Hafers, Auftreten in Nährlösungen. 81
— — —, Bekämpfung mit Mangansulfat. 82
— — —, Ursache und Bekämpfung. 81
Doux, Milchkonservierungsmittel. 196
Drahtwürmer, Bekämpfung. 101
Drypetes, Vorkommen von Peltistroma juruanum. 636
Dürrfleckenkrankheit der Kartoffel durch Alternaria solani. 172

Eier, bakteriologische Untersuchung. 611
—, Haltbarkeit befruchteter und unbefruchteter. 620
—, Konservierung. 621
—, Vorkommen von Bacillus diphtheriae. 617
—, — in Bakterien. 612. 617
Eisen, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
—, schwefeliges, Ablagerung in Bakterien. 113
Eisenoxyd, kolloidales, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Eisenvitriol, Abtötung von Hefe. 121
Enchelys, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
—, — — Mannitlösung. 599
—, — — Omelianskylösung. 600
Enterecoccus, Vorkommen im Darm. 142
Enzyme, Gärungs- der Hefe, Veränderung. 117
—, Kapillaranalyse. 116
—, Wirkung auf Leinsamenschleim. 165
Enzymgehalt der Milch euterkranker Kühe. 182
— von Pilzen, Wirkung der Nährlösung. 167
Epicoccum purpurascens, Sauerstoffspeicherung. 112
Epipactis, Vorkommen von Harnstoff. 170
Equisetum, Vorkommen von Harnstoff. 170

Erde, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Erfrieren der Pflanzen, Schutzwirkung verschiedener Stoffe. 84
Erysiphe graminis, Widerstandsfähigkeit gegen niedrige Temperaturen. 98
Essigbakterien s. Bakterien, Essig-.
Essigsäure, Wirkung auf Zymase. 122
Eugenia, Vorkommen von Trichopeltina chilensis. 631

Fadenziehen des Bieres durch Ascobacterium luteum. 129
Fagus silvatica, Wurzelkrümmungen, exzentrisches Dickenwachstum. 172
Farbstoff, Bildung durch Bakterien. 113
—, — — Pilze. 115. 165
Fermente, Schutz-, des tierischen Organismus. 116
Filtrierpapier, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Flagellaten, Cysten, Wirkung hoher Temperaturen. 604
Flechten, Zugehörigkeit von Trichopeltis ferruginea. 636
—, — — Trichopeltis oblecta. 636
Fleisch, Konserven, Sterilisationsmethode. 161
Floriasaatenschutz, Bekämpfungsversuche gegen Weizensteinbrand. 91
Flugbrand der Gerste, Bekämpfung mit Heißluft. 92
— — —, — — Heißwasser. 92
— des Hafers, Bekämpfung im Fichtelgebirge. 92
— — Weizens, Bekämpfung mit Heißwasser. 92
Flugbrandbefall des Weizens, Beziehung zur Korngröße. 92
Flughafer s. a. Avena fatua.
—, Bekämpfung. 87
—, Keimfähigkeit unreif geernteter Samen. 87
Fluorammonium, Widerstandsfähigkeit von Hefe. 201
Flußsäure, Wirkung auf Zymase. 122
Forbin, Zusammensetzung. 100
Formaldehyd, Bekämpfungsversuche gegen Roggenstengelbrand. 91
—, Bekämpfungsmittel gegen Weizensteinbrand. 90
— - Vakuum-Desinfektion, Theorie und Praxis. 198
—, Wirkung auf die Keimfähigkeit des Weizens. 90
—, — — Zymase. 123
Formalin, Bekämpfungsmittel gegen Fusarium nivale. 97
—, Widerstandsfähigkeit von Hefe. 201
Fritfliege, Schädling von Getreide. 100
Fusarien, Vorkommen im Boden. 98
—, Widerstandsfähigkeit gegen niedrige Temperaturen. 98
Fusarium n. sp., Zellulosezerstörung. 167
Fusarium, Artunterscheidung, Wert der Basalzelle. 660
—, Erreger der Blattrollkrankheit der Kartoffel. 172
—, Zugehörigkeit zu Ophiobolus. 100
— gemmiperda, Vorkommen auf Prunus triloba. 660
— hibernans, Identität mit F. nivale. 95
— metachroum, Schädling von Getreide. 96
— minimum, Identität mit F. nivale. 95
— nivale s. a. Schneeschimmel.
— —, Bekämpfung mit Chinosol. 97
— —, — — Formalin. 97
— —, — — Kupfervitriol. 97
— —, — — Sublimat. 97
— —, Beziehung zu Calonectria. 96
— —, — — Nectria graminicola. 95
— —, Erreger der Fußkrankheit des Getreides. 96
— —, Identität mit F. hibernans. 95
— —, — — F. minimum. 95
— rubiginosum, Schädling von Getreide. 96
— subulatum, Schädling von Getreide. 96
— willkommii, Zugehörigkeit zu Nectria ditissima. 649
Fußkrankheiten des Getreides, häufiges Auftreten. 99
— — —, Bedeutung der Witterung. 99
— — — durch Fusarium nivale. 96
— — —, Vorbeugungsmittel. 99
Furfurol, Bildung und Umsetzung im Gärungsgewerbe. 202
Futterstoffe, Untersuchung auf gärungsfähige Mikroorganismen. 163

Gärung, Alkohol-, Acetaldehyd Zwischenprodukt. 124
—, —, Beschleunigung durch Salze organischer Säuren. 127
—, —, Mechanismus. 123
—, —, Nachweis von Acetaldehyd mit Natriumphosphat. 166
—, —, Reaktionsphasen. 175
—, —, Wirkung von Ammoniumformiat. 152
—, —, Wirkung von Kolloiden. 125
—, —, — — Zinkchlorid. 124
— durch Bakterien, Wirkung von Malachitgrün und Brillantgrün. 398. 402
—, Schwefelwasserstoff durch Microspira desulfuricans. 113
—, Wein-, Wirkung des Lichtes. 149
—, Wirkung von Chemikalien. 122
—, — toter Hefezellen. 202
—, Zitronensäure-, Untersuchung. 164
—, zuckerfreie, bei Stereoisomeren. 118
—, —, Untersuchung. 125
Gärungsgewerbe, Bildung und Umsetzung von Furfurol. 202
Gärungsprobe zum Nachweis fäkaler Verunreinigung von Wasser. 75

Galaktose, Vergärung durch Saccharomyces anamensis. 41
Galium aparine, Biologie. 88
Galle, Wirkung auf die Fermentation von Amidon. 118
—, — — — — — — Glykogen. 118
—, — — — — — — Glykose. 118
Gelbsucht der Kartoffel. 172
Gerbsäure, Wirkung auf Aspergillus niger. 166
—, — — Penicillium. 166
Gerbsäuregehalt der Nährlösung, Wirkung auf den Tannasegehalt von Aspergillus niger und Penicillium. 167
Gerste, Flugbrand, Bekämpfung mit Heißluft. 92
—, —, — — Heißwasser. 92
—, Schädigung durch Chlorops taeniopus, Bedeutung der Saatzeit. 100
—, — — Limothrips denticornis. 100
—, Streifenkrankheit, Bekämpfung mit Kupfervitriol. 100
Getreide, Anerkennung, Bedeutung der Pilzkrankheiten. 97
—, Aussaattiefe, Wirkung auf den Ertrag. 84
—, Auswachsen, Vorbeugungsmaßregeln. 83
—, Beizempfindlichkeit. 83
—, Dörrfleckenkrankheit, Auftreten in Nährlösungen. 81
—, —, Bekämpfung mit Mangansulfat. 82
—, —, Ursache und Bekämpfung. 81
—, Entwicklung, Bedeutung der Bodenbearbeitung. 85
—, Flugbrand, Bekämpfung mit Heißluft. 92
—, —, — — Heißwasser. 94
—, Flugbrandbefall, Beziehung zur Korngröße. 92
—, Fußkrankheiten, häufiges Auftreten. 99
—, —, Bedeutung der Witterung. 99
—, Fußkrankheit durch Fusarium nivale. 96
—, Fußkrankheiten, Vorbeugungsmittel. 99
—, Keimfähigkeit, Wirkung von Heißwasser. 90
—, —, — — Lysoform. 90
—, Kornertrag, Wirkung von Halmverletzungen. 96
—, Lagerfestigkeit, Bedeutung der Kalidüngung. 83
—, —, — — Phosphordüngung. 83
—, —, Bestimmung. 82
—, Mehltau, Vorbeugungsmaßregeln. 100
—, Rost, Bekämpfungsversuche mit Gips. 94
—, Saatenschutz gegen Vogelfraß. 102
—, Schädigung durch Anthothrips aculeatus. 100
—, — — Blasenfüße, Bedeutung der Saatzeit. 100
Getreide, Schädigung durch Blattläuse. 100
—, — — Chlorops taeniopus, Bedeutung der Saatzeit. 100
—, — — Fritfliege. 100
—, — — Fusarium metachroum. 96
—, — — Fusarium rubiginosum. 96
—, — — Fusarium subulatum. 96
—, — — Hadena basilinea. 88
—, — — Kaliumchloriddüngung. 82
—, — — Kalkmangel des Bodens. 85
—, — — Limothrips denticornis. 100
—, — — Nematoden. 81
—, — — Radium. 84
—, — — Rauch. 85
—, — — Säureanreicherung im Boden. 82
—, — — Scolecotrichum. 82
—, — — Trockenheit in bestimmten Entwicklungsstadien. 84
—, — — Zinksalze. 85
—, — — Zwergmäuse. 102
—, Schädlinge, Vorkommen auf Quecke. 88
—, Streifenkrankheit, Bekämpfung mit Kupfervitriol. 100
—, Triebkraft, Bestimmung in Ziegelmehl. 96
—, Verletzungen der Fruchtschale infolge von Trockenheit. 83
—, Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten, mechanische Bestimmungen. 101
—, Winterfestigkeit, Vererbung. 85
Getreidehähnchen, Entwicklung. 101
Getreidemehltau, Vorkommen auf Quecke. 88
Giltaylösung, Entwicklung von Protozoen. 599
Gips, Bekämpfungsversuche gegen Getreiderost. 94
Gliocladium viride, Zellulosezerstörung. 167
Glomerella rufomaculans, Enzyme. 120
Glutaminsäure, d-, Spaltung durch Bakterien. 112
Glykogen, Fermentation, Wirkung von Rindsgalle. 118
Glykose, Fermentation, Wirkung von Rindsgalle. 118
Griselinia, Vorkommen von Leptothyrium. 635
Grün, Pariser-, Wirkung auf Ammoniakbildung im Boden. 548
—, —, — — die Nitratbildung im Boden. 552
Gymnadenia, Vorkommen von Harnstoff. 170
Gyromitra gigas, Vorkommen von Chromogen. 121
— —, — — Tyrosinase. 121

Hadena basilinea, Schädling von Getreide. 88
— —, Vorkommen auf Quecke. 88

Hafer, Dörrfleckenkrankheit, Auftreten in Nährlösungen. 81
—, —, Bekämpfung mit Mangansulfat. 82
—, —, Ursache und Bekämpfung. 81
—, Flugbrand, Bekämpfung im Fichtelgebirge. 92
—, Schädigung durch Nematoden. 81
—, — — Radium. 84
—, — — Scolecotrichum. 82
—, — — Zinksalze. 85
Haplographium echinatum, Zellulosezerstörung. 167
Harnstoff, Spaltung durch Bakterien. 209. 282
—, Vorkommen in Aspidium. 170
—, — — Coprinus diaphanus. 170
—, — — Coprinus stellaris. 170
—, — — Epipactis. 170
—, — — Equisetum. 170
—, — — Gymnadenia. 170
—, — — Listera ovata. 170
—, — — Neottia. 170
—, — — Ophrys muscifera. 170
—, — — Polygala. 170
Hederich, Bekämpfungsversuche mit Kainit. 89
—, — — Kalkstickstoff. 89
—, Keimfähigkeit unreif geernteter Samen. 87
—, Keimung, Bedeutung des Umlagerns der Samen. 86
Hedycarya dentata, Vorkommen von Trichopeltula hedycaryae. 636
Hefe, Abtötung durch Eisenvitriol. 121
—, — — Kupfervitriol. 121
—, Beeinflussung der Desinfektionswirkung verschiedener Antiseptika. 200
—, Chemie. 123
—, Eiweißspaltung in Gegenwart von Zinkchlorid. 124
—, Gärungsenzyme, Veränderung. 117
—, Invertasegehalt, Veränderung. 117
—, Kristalle, Untersuchung. 126
—, Mischkulturen, Wirkung auf die Inversion des Rohrzuckers. 129
—, Morphologie und Physiologie, Lehrbuch. 128
—, Nahrungsaufnahme. 128
—, Sauerstoffspeicherung. 112
—, schwarze, Untersuchung. 1
—, Selbstgärung, Bedingungen und biologische Bedeutung. 124
—, Selbstverdauung, Untersuchung. 203
—, Spaltung von Oxyfumarsäure. 118
—, Systematik, Lehrbuch. 128
—, Vorkommen von Ketonaldehydmutase. 121
—, Wirkung von Aluminium. 122
—, Widerstandsfähigkeit gegen Antiformin. 201
—, — — Fluorammonium. 201
—, — — Formalin. 201
—, — — Sublimat. 201
—, Wirkung von Kadmiumvitriol. 122
Hefe, Wirkung von Kobaltnitrat. 122
—, — — Manganvitriol. 122
—, — — Nickelsulfat. 122
—, — toter Zellen auf die Gärung. 202
—, — von Zinkvitriol. 121
Hefeeiweiß, Totalhydrolyse. 203
Hefesaft, Reduktion von Acetaldehyd. 125
Heißluft, Bekämpfungsmittel gegen Gerstenflugbrand. 92
Heißwasser, Bekämpfugsnmittel gegen Gerstenflugbrand. 92
—, — — Weizenflugbrand. 92
—, Bekämpfungsversuche gegen Roggenstengelbrand. 91
—, Wirkung auf die Keimfähigkeit des Weizens. 90
Hemipteren, intrazellulare Symbionten. 169
Hemisphaeriales, Systematik. 629
Hessenfliege, Auftreten, Gesetzmäßigkeit. 101
Heyls concentrated Nitrogen Producer, Untersuchung. 157
Hippursäure, Spaltung durch Schimmelpilze. 118
Hochmoorboden s. Boden, Hochmoor-.
Hühnereier s. Eier.
Huflattich, Bekämpfung. 90
Humus, Bildung bei der Zersetzung von Zellulose. 168

Insekten, Bekämpfungsmittel. 101
Invertase, Schädigung durch Ammoniakgas. 118
—, Wirkung von Chlorwasserstoff. 119
—, — — Stickoxyd. 119
Invertasegehalt der Hefe, Veränderung. 117
Johanniskäfer, Leuchten, Zweckmäßigkeit. 112

Kadmiumvitriol, Wirkung auf Bakterien. 122
—, — — Hefe. 122
Käfer, Schädlinge von Kartoffeln. 172
Käse, bankrote, Ursache. 147
—, Bereitung, Bedeutung des Säuregrades der Milch. 147
—, Cheddar-, Fehler. 449
—, —, Vorkommen von Torula-Arten. 449
—, Kamembert-, Bereitung, Mazésches Verfahren. 147
—, Rotfärbung durch Lagern auf Weißtannenholz. 147
—, Schweizer-, Bereitung, Verwendung von Kasol. 148
—, Stilton-, Vorkommen von Bacillus acidi lactici. 146
—, —, — — Penicillium glaucum. 146
—, —, — — Streptococcus lacticus. 146
—, —, — — Torula. 146
—, —, — — Tyrothrix. 146
—, Vergiftung durch Bacterium lactis aerogenes. 144

Käsereimolke, Vorbrechen und Scheiden. 146
Kainit, Bekämpfungsversuche gegen Disteln. 90
—, — — Hederich. 89
Kakao, Fermentation. 161
Kalidüngung, Bedeutung für die Lagerfestigkeit des Getreides. 83
Kaliumchloriddüngung, Schädigung von Weizen. 82
Kaliumkarbonat, Wirkung auf Zymase. 122
Kalk, Wirkung auf die Nitratbildung im Boden. 461
Kalkarmut des Bodens in der Nähe von Hüttenwerken. 85
Kalkdüngung, Wirkung auf Hochmoorboden. 158. 159
Kalkstickstoff, Bekämpfungsversuche gegen Hederich. 89
Kamembertkäse s. Käse, Kamembert-.
Karboxylase, Unterschied von Zymase. 125
Kartoffel, Blattrollkrankheit durch Fusarium. 172
—, Dürrfleckenkrankheit durch Alternaria solani. 172
—, Gelbsucht. 172
—, Krautfäule durch Phytophthora infestans. 172
—, Schädigung durch Blattläuse. 172
—, — — Käfer. 172
—, — — Schmetterlingsraupen. 172
—, — — Wanzen. 172
—, Schwarzbeinigkeit durch Bacillus phytophthorus. 172
Kasol, Verwendung zur Bereitung von Schweizerkäse. 148
Katalasegehalt der Milch, Bedeutung für ihren Wert. 141
— — — bei Maul- und Klauenseuche. 183
Katalog, internationaler, für Botanik. 110
Ketonaldehydmutase, Vorkommen in Hefe. 121
Klee, Einsäuerung mit Monocalciumphosphat. 163
Klettenlabkraut s. Galium aparine.
Knightia excelsa, Vorkommen von Trichopelteen. 635
Knöllchenbakterien s. Bakterien, Knöllchen-.
Kobaltnitrat, Wirkung auf Hefe. 122
Kolloide, Wirkung auf Alkoholgärung. 125
Korndarre, baltische. 84
Kräuselkrankheit der Tabakpflanze durch Thrips. 169
Krautfäule der Kartoffel durch Phytophthora infestans. 172
Krebs des Apfelbaumes, Anatomie. 650
— — — durch Nectria ditissima. 642
— der Obstbäume, Bedeutung von Frost. 644
—— —, Geschichte und Entstehung. 641
— — —, Widerstandsfähigkeit einzelner Sorten. 663
Krupuk der Tabakpflanze, Ursache. 169
Kühe, euterkranke, Enzymgehalt der Milch. 182
—, Frischmilchen, Nachweis, Wert der Schardinger-Reaktion. 180
—, Maul- und Klauenseuche, Enzymgehalt der Milch. 183
—, pathologische Eutersekrete, Nachweis durch die Labhemmprobe. 182
Kupfer, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
Kupfervitriol, Abtötung von Hefe. 121
—, Bekämpfungsmittel gegen Fusarium nivale. 97
—, — — Streifenkrankheit der Gerste. 100
—, — — Weizensteinbrand. 90
— + Sublimat, Bekämpfungsmittel gegen Weizensteinbrand. 90

Labhemmprobe der Milch zum Nachweis pathologischer Eutersekrete. 182
Laktase, Fehlen in den Brustdrüsen. 120
Lävulose, Vergärung durch Saccharomyces anamensis. 41
Lagerfestigkeit des Getreides, Bedeutung der Kalidüngung. 83
— — —, — — Phosphordüngung. 83
— — —, Bestimmung. 82
Lanaskrankheit der Tabakpflanze, Bekämpfung. 169
— — — durch Phytophthora nicotianae. 169
Lauraceen, Vorkommen von Peltistroma juruanum. 636
Leguminosen, Impfversuche in den Kolonien. 156
Lein, Schädigung durch Nematoden. 81
Leinkuchenmehl, verschimmeltes, Schädigung des Viehs. 164
Leinsamen, Schleim, Wirkung von Enzymen und Bakterien. 165
Leptothyrium, Vorkommen auf Griselinia. 635
— panacis, Vorkommen auf Panax arboreum. 635
Leuchten der Organismen, Zweckmäßigkeit. 112
Leukocytenzahl, Wirkung auf die Reaktion der Milch. 180
Licht, Bedeutung für die Keimung von Apera spica venti. 87
—, — — — Keimfähigkeit der Quecke. 88
—, ultraviolettes, Sterilisation von Wasser. 189
—, —, — — —, Bedeutung der Durchsichtigkeit. 191
—, —, Wirkung auf Bakterien. 185. 189. 191
—, Wirkung auf die Weingärung. 149
Limothrips denticornis, Schädling von Gerste. 100
Listera ovata, Vorkommen von Harnstoff. 170

Luft, Bakteriengehalt, Bestimmungsmethode. 188
Lupine, Impfversuche mit Knöllchenbakterien. 156
Lysoform, Bekämpfungsmittel gegen Weizensteinbrand. 90
—, Wirkung auf die Keimfähigkeit des Weizens. 90

Mäuse, Bekämpfung, Wert des Cisar-Räucherungsverfahrens. 103
—, — mit „Schädlingsvertilger". 103
—, — — Schwefelkohlenstoff. 103
—, Bekämpfungsversuche mit Mäusetyphusbazillen. 102
—, — — Strychninhafer. 102
Mäusetyphusbazillen, Bekämpfungsversuche gegen Mäuse. 102
Mais, Schädigung durch Diabrotica virgifera. 101
—, — — Hadena basilinea. 88
Malachitgrün, Widerstandsfähigkeit von Bacillus lactis aerogenes. 404
—, Wirkung auf die Gasbildung von Bakterien. 398. 402
Maltose, Vergärung durch Saccharomyces anamensis. 41
Mangansulfat, Bekämpfungsmittel gegen Dörrfleckenkrankheit des Hafers. 82
Manganvitriol, Wirkung auf Hefe. 122
Manihot utilissima, Fermentation. 161
Mannitlösung, Entwicklung von Protozoen. 599
Mazésches Verfahren zur Bereitung von Kamembertkäse. 147
Mehltau des Getreides, Vorbeugungsmaßregeln. 100
Meliana albilinea, natürliche Feinde. 101
Mergel, Wirkung auf leichte Böden. 153
Methylglyoxal, Überführung in Milchsäure. 121
Micrococcus aureus, Alkali- und Säurebildung. 111
— pallidus, Vorkommen an Gras. 411
— —, — in Milch. 411
— pyogenes aureus, Vorkommen in Eiern. 618
— tetragenus, Vorkommen in Eiern. 617
Microspira desulfuricans, Schwefelwasserstoffgärung. 113
— —, Unterschied von Actinomyces pelogenes. 444
Microthyriaceen, Unterschiede von Trichopelteen. 625
Mikroorganismen, Kultur, Anleitung. 174
Milch, Alkoholprobe, Beziehung zu Krankheiten der Kühe. 181
—, Backhaus-, Bereitung. 195
—, Bakterienflora, Beziehung zu der Bakterienflora der Weide. 411
—, Bakteriengehalt, mikroskopische Beurteilung. 140
—, Bakteriologie. 139
—, biologische Untersuchung, Methode. 132
Milch, Brunst-, Ursache von Erkrankungen der Säuglinge. 133
—, Entkeimung mit Biorisator. 195. 196
— euterkranker Kühe, Enzymgehalt. 182
—, Fehler durch Bacterium trifolii. 414
—, Fermentgehalt. 138
—, neuer Flaschenverschluß. 194
—, Frauen-, Fermentgehalt. 138
—, Haltbarkeit, Nachweis, Wert der Alizarolprobe. 183
—, Hygiene, Grundriß für Tierärzte. 137
—, hygienische Gewinnung. 131. 132
—, Kannendesinfektion. 194
—, Katalasegehalt, Bedeutung für ihren Wert. 141
—, — bei Maul- und Klauenseuche. 183
—, Keimgehalt, Wirkung von Saugflaschen mit Rohr. 135
—, Koagulation durch Aspergillus scheelei var. scheelei. 114
—, kommunale Versorgung. 138
—, Konservierungsmittel Doux. 196
—, Kontrolle in New York. 135
—, Kristall-Milchfilter. 194
—, Labhemmprobe zum Nachweis pathologischer Eutersekrete. 182
—, Moskauer, Bakteriengehalt. 54
—, Reaktion, Wirkung der Leukocytenzahl. 180
—, Reduktasegehalt bei Maul- und Klauenseuche. 183
—, rohe, für Säuglinge, Gewinnung und Behandlung. 132. 138
—, Säuregehalt, Bedeutung für die Käsebereitung. 147
—, Sterilisation, Kochen und Pasteurisation. 193
—, Sterilisierung, Steroverfahren. 179
—, Streptokokken, Fermentation von Kohlehydraten. 134
—, —, Unterschied von Schlundstreptokokken. 134
—, Trocken-, Veränderung der Fettkügelchen. 135
—, —, — des Kaseïns. 135
—, —, Wert. 135
—, Untersuchung auf gärungsfähige Stoffe. 163
—, — in Moskau. 53
—, Veränderung durch die Brunst. 133
—, Vorkommen von Abortusbazillen. 136
—, — — Bacterium chromoflavum. 141
—, — — Bakterien. 141
—, wirtschaftliche Tagesfragen. 137
Milchferment, Anpassung an Arsenverbindungen. 120
Milchsäure, Bildung aus Methylglyoxal. 121
—, Wirkung auf Zymase. 122
Milchsäurebakterien s. Bakterien, Milchsäure-.
Milchsäurelangstäbchen. 141
Milchwirtschaft, wissenschaftliche Anstalt, Denkschrift. 195

Mist, Stall-, Wirkung auf die Ammoniakbildung im Boden. 529
—, —, — — den Bakteriengehalt des Bodens. 527
—, —, — — die Nitratbildung im Boden. 537
Mohrrübensaft, Nährboden für Bakterien und Pilze. 174
Monas guttula, Entwicklung in Giltaylösung. 599
Monas mülleri, Schwefeleinschlüsse. 160
— vivipara, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
Monascus purpureus, Sauerstoffspeicherung. 112
Monocalciumphosphat, Einsäuerung von Klee. 163
Moor, Wirkung auf leichte Böden. 153
Mosaikkrankheit der Tabakpflanze, Infektionsversuche. 169
Mutterkorn s. a. Claviceps purpurea.
—, Alkaloidgehalt. 100
—, Vorkommen auf Quecke. 88
Mycoderma, Zugehörigkeit von Zymonema. 125
— lambica n. sp., Verhalten gegenüber verschiedenen Zuckerarten. 202
— vanlaeriana n. sp., Verhalten gegenüber verschiedenen Zuckerarten. 202
Mykologie, technische, Vorlesungen. 107
Myrtaceen, Vorkommen von Trichopeltis pulchella. 633

Nährsalze, Vorkommen pathogener Bakterien. 166
Natriumphosphat, Nachweis von Acetaldehyd bei alkoholischer Gärung. 166
Natto, Vorkommen von Bacillus natto. 114
Nectria ditissima, Erreger des Apfelbaumkrebses. 642
— —, Zugehörigkeit von Fusarium willkommii. 649
— graminicola, Beziehung zu Fusarium nivale. 95
Nematoden, Schädlinge vom Hafer. 81
—, — von Lein. 81
—, — — Pferdebohnen. 81
—, — — Zuckerrüben. 81
—, Vorkommen in Bierfilzen. 74
Neottia, Vorkommen von Harnstoff. 170
Nickel, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
Nickelsulfat, Wirkung auf Hefe. 122
Nitragin, Impfversuche. 156
Nitrate, Assimilation durch Aktinomyceten. 576
Nitrat, Bildung im Boden, Bedeutung des Wassergehaltes. 154
—, — — —, Wirkung von Ammoniumsulfat. 460
—, — — —, — — Arsen. 551
—, — — —, — — Arsentrisulfid. 552
—, — — —, — — Bleiarsenat. 552
Nitrat, Bildung im Boden, Wirkung von Bodenart und Feuchtigkeit. 427
—, — — —, — verschiedener Düngermengen. 537
—, — — —, — von Kalk. 461
—, — — —, — — Parisergrün. 552
—, — — —, — — Sand. 461
—, — — —, — — Schwefeldüngung. 160
—, — — —, — — Schwefelkohlenstoff. 584
—, — — —, — — Temperatur und Feuchtigkeit. 458
—, — — —, — — Toluol. 584
—, — — —, — — Zinkarsenat. 552
Nitrobakterine, Impfversuche. 156

Obstbäume, Krebs, Anatomie. 650
—, —, Bedeutung von Frost. 644
—, — durch Bacterium mali. 644
—, — — Nectria ditissima. 642
—, —, Geschichte und Enststehung. 641
—, Widerstandsfähigkeit einzelner Sorten gegen Krebs. 663
Oicomonas dallingeri, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
— —, — — Giltaylösung. 599
— termo, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
Olearia argophylla, Vorkommen von Brefeldiella brasiliensis. 637
Omelianskylösung, Entwicklung von Protozoen. 600
Ophiobolus, Zugehörigkeit von Fusarium. 100
— graminis, Vorkommen auf Quecke. 88
— herpotrichus, Zugehörigkeit von Acremonium. 663
Ophrys muscifera, Vorkommen von Harnstoff. 170
Opsine, Wert als Nährboden. 174
Organismen, Leuchten, Zweckmäßigkeit. 112
Orthoklas, Zersetzung durch Bodenbakterien. 155
Oxalsäure, Wirkung auf Zymase. 122
Oxyfumarsäure, Spaltung durch Hefe. 118
Oxytrichia pellionella, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
— —, — — Mannitlösung. 599
Ozon, Desinfektionsmittel in der Brauerei. 201. 203

Panax arboreum, Vorkommen von Asterina pulla. 635
— —, Vorkommen von Leptothyrium panacis. 635
Parisergrün, Wirkung auf Ammoniakbildung im Bodeu. 548
—, — — Nitratbildung im Boden. 552
Pediculoides gramineus, Vorkommen auf Quecke. 88

Peltistroma juruanum, Vorkommen auf Drypetes. 636
— —, — — Lauraceen. 636
Penicillium, Vorkommen in gefrorenem Boden. 152
—, Wirkung von Gerbsäure. 166
—, Zellulosezerstörung. 167
— africanum, Zellulosezerstörung. 167
— citricolum, Farbstoffbildung. 115
— claviforme, Zellulosezerstörung. 164
— divergens n. sp., Farbstoffbildung. 115
— expansum, Zellulosezerstörung. 167
— glaucum, Entwicklung, Wirkung von Benzoë-Derivaten. 187
— —, Vorkommen im Stilton-Käse. 146
— —, Zonenbildung. 116
— herquei n. sp., Farbstoffbildung. 115
— luteum, Zellulosezerstörung. 167
— pinophilum, Zellulosezerstörung. 167
— roseum, Zellulosezerstörung. 167
— rugulosum, Tannasegehalt, Wirkung des Gerbsäuregehaltes der Nährlösung. 167
— —, Zellulosezerstörung. 167
— stoloniferum, Zellulosezerstörung. 167
— variabile n. sp., Selbstvergiftung bei Zusatz von schwefelsaurem Ammoniak. 186
— varians n. sp., Farbstoffbildung. 116
Pferdebohne, Schädigung durch Nematoden. 81
Pflanzen, Bedeutung für die Selbstreinigung des Wassers. 188
—, Erfrieren, Schutzwirkung verschiedener Stoffe. 84
—, mykotrophe, Ernährungsphysiologie. 170
—, Wurzelkrümmungen, exzentrisches Dickenwachstum. 172
Phosphordüngung, Bedeutung für die Lagerfestigkeit des Getreides. 83
Phytopathologie, Grundzüge. 171
Phytophthora infestans, Erreger der Krautfäule der Kartoffel. 172
— —, Überwinterung. 482
— nicotianae, Erreger der Lanaskrankheit der Tabakpflanze. 169
Pilze, Enzymgehalt, Wirkung der Nährlösung. 167
—, Farbstoffbildung. 115. 165
—, physiologische Eigenschaften, diagnostischer Wert. 497
—, Sauerstoffspeicherung. 111
—, Schimmel-, Spaltung von Hippursäure. 118
—, Zerstörung von Zellulose. 167
Picea excelsa, Wurzelkrümmungen, exzentrisches Dickenwachstum. 172
Piper, Vorkommen von Trichopeltis (?) reptans. 634
—, — — Trichothyrium dubiosum. 636
Polygala, Vorkommen von Harnstoff. 170
Protozoen, Cysten, Wirkung hoher Temperaturen. 603
Protozoen, Entwicklung, Beziehung zur Bakterienentwicklung. 600
—, Inaktivität gegenüber Bodenbakterien. 152
—, Wirkung von Schwefelkohlenstoff und Toluol. 158
Prowazekia terricola, Entwicklung in Blutmehllösung. 598
Prunus triloba, Vorkommen von Fusarium gemmiperda. 660
Pseudomonas effusa n. sp., Zellulosezerstörung. 515
— — var. non liquefaciens n. var., Zellulosezerstörung. 516
— perlurida n. sp., Zellulosezerstörung. 516
— — var. virginiana n. var., Zellulosezerstörung. 517
— tralucida n. sp., Zellulosezerstörung. 517
— trifolii s. Bacterium trifolii.
Puccinia graminis, Sporidienbildung, Bedingungen. 93
— —, Überwinterung. 93
— — f. secalis, Vorkommen auf Quecke. 88
— triticina, Schädling von Triticum compactum. 95
— —, Widerstandsfähigkeit von Triticum durum. 95
— —, — verschiedener Weizenarten. 95
Pycnocarpon, Diagnose. 639
— magnificum, Vorkommen auf Terminalia. 639
Pyknothecien, Entwicklung. 627

Quecke, Bedeutung als Wirtspflanze von Getreideschädlingen. 88
—, Bekämpfung. 89
—, Keimfähigkeit. Bedeutung des Lichts. 88
—, Rhizome, Entwicklung in verschiedenen Bodentiefen. 88
—, Vorkommen von Getreidemehltau. 88
—, — — Getreideschädlingen. 88
—, — — Hadena basilinea. 88
—, — — Mutterkorn. 88
—, — — Ophiobolus graminis. 88
—, — — Pediculoides gramineus. 88
—, — — Puccinia graminis f. secalis. 88
—, — — Sclerospora graminicola. 88
—, — — Tarsonemus calmicola. 88

Radium, Schädigung von Getreide. 84
Raffinose, Vergärung durch Saccharomyces anamensis. 41
Rauchschaden an Getreide. 85
Reduktasegehalt der Milch bei Maul- und Klauenseuche. 183
Regenwürmer, Bedeutung für die Umsetzungen im Boden. 154
Roggen, Aussaattiefe, Wirkung auf den Ertrag. 84

Roggen, Schädigung durch Anthothrips aculeatus. 100
—, — — Hadena basilinea. 88
—, — — Radium. 84
—, Stengelbrand, Auftreten, Bedeutung der Saatzeit. 91
—, —, Bekämpfungsversuche mit Formaldehyd. 91
—, —, — — Heißwasser. 91
Rohrzucker, Inversion durch Hefe, Wirkung von Mischkulturen. 129
Rohrzuckersyrup, Vorkommen von Saccharomyces zopfii. 468
Rost, Widerstandsfähigkeit von Weizen, Vererbbarkeit. 94
— des Getreides, Bekämpfungsversuche mit Gips. 94

Saatenschutzmittel gegen Vogelfraß. 102
Saccharomyces anamensis n. sp., Morphologie. 27
— — — —, Physiologie. 39
— — — —, Sporenbildung. 27
— — — —, Vergärung verschiedener Zuckerarten. 41
— bruxellensis n. sp., Verhalten gegenüber verschiedenen Zuckerarten. 202
— zopfii, Vorkommen in Rohrzuckersyrup. 468
— —, Widerstandsfähigkeit gegen hohe Temperaturen. 472
Saccharose, Vergärung durch Saccharomyces anamensis. 41
Säuren, organische, Beschleunigung der Alkoholgärung. 127
Salpeterbildung im Boden, Wirkung von Bodenart und Feuchtigkeit. 430
Salzsäure, Wirkung auf Zymase. 122
Sand, Wirkung auf die Nitratbildung im Boden. 461
Sarcina aurantiaca, Wirkung niedriger Temperaturen. 150
— liquefaciens, Vorkommen an Gras. 411
— —, — in Milch. 411
Sauerstoff, Speicherung durch Bakterien und Pilze. 111
„Schädlingsvertilger“ zur Mäusebekämpfung. 103
Schardinger-Reaktion, Wert zum Nachweis des Frischmilchens der Kühe. 180
Schmetterlingsraupen, Schädlinge der Kartoffel. 172
Schneeschimmel s. a. Fusarium nivale.
—, Bekämpfung. 98
—, Entwicklung, Bedeutung der Feuchtigkeit. 96
Schwarzbeinigkeit der Kartoffel durch Bacillus phytophthorus. 172
Schwefel, Speicherung durch Monas mülleri. 160
—, — — Thiovulum majus und T. minus. 160
Schwefeldüngung, Wirkung auf Ammoniakbildung im Boden. 160
Schwefeldüngung, Wirkung auf die Nitratbildung im Boden. 160
Schwefelkohlenstoff, Bekämpfungsmittel gegen Mäuse. 103
—, Wirkung auf den Bakteriengehalt des Bodens. 158
—, — — die Nitratbildung im Boden. 584
—, — — Protozoen. 158
Schwefelsäure, Wirkung auf Zymase. 122
Schwefelwasserstoffgärung s. Gärung, Schwefelwasserstoff-.
— durch Actinomyces pelogenes. 442
Schweizerkäse s. Käse, Schweizer-.
Sclerospora graminicola, Vorkommen auf Quecke. 88
Scolecotrichum, Schädling vom Hafer. 82
Serradella, Impfversuche mit Heyls concentrated Nitrogen Producer. 157
—, — — Knöllchenbakterien. 156
Silber, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
—, Wirkung auf das Wachstum von Aspergillus flavus. 186
—, — — — — — — Aspergillus fumigatus. 186
—, — — — — — — Aspergillus niger. 187
—, — — — — — — Sterigmatocystis nigra. 186
Silene conica, Verbreitung in Bayern. 89
Siliciumoxyd, kolloidales, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Silikate, Zersetzung durch Bakterien. 155
Sperlinge, Vertilgung durch Aufhängen künstlicher Nester. 102
Sphaerotilus natans, Identität mit Cladothrix dichotoma. 370
Spirillum tenue, Vorkommen in Eiern. 618
Sporotrichum radicicolum, Zellulosezerstörung. 167
— sporulosum, Zellulosezerstörung. 167
— thebaicum, Zellulosezerstörung. 167
Staphylococcus albus, Vorkommen in Eiern. 617
— aureus s. a. Bacillus aurococcus.
— —, Vorkommen in Eiern. 617
Steinbrand des Weizens, Auftreten, Bedeutung der Saatzeit. 91
— — —, Bekämpfung mit Cuprocorbin. 91
— — —, — — Formaldehyd. 90
— — —, — — Kupfervitriol. 90
— — —, — — Lysoform. 90
— — —, — — Sublimat + Kupfervitriol. 90
— — —, Bekämpfungsversuche mit Antiavit. 91
— — —, — — Antimycel. 91
— — —, — — Corbin. 91
— — —, — — Floriasaatenschutz. 91
— — —, — — Sublimat. 90
— — —, — — Sublimoform 90
— — —, Deformierung der Ähren. 91
— — —, Überwinterung im Boden. 91
Steinkohlenteer-Karbolineum, Wert als Saatenschutzmittel. 102

Stengelbrand des Roggens, Auftreten, Bedeutung der Saatzeit. 91
— — —, Bekämpfungsversuche mit Formaldehyd. 91
— — —, — — Heißwasser. 91
Sterigmatocystis nigra, Wirkung von Silber auf das Wachstum. 186
Steroverfahren zur Sterilisierung von Milch. 179
Stickoxyd, Wirkung auf Diastase. 119
—, — — Invertase. 119
Stickstoff, Assimilation durch Wurzelpilze. 170
—, Bindung durch Azotobacter, Wirkung von Aktinomyceten. 582
—, Umsetzung im Boden, Bedeutung der Aktinomyceten. 561
—, —, Wirkung der Bodenart. 422
—, —, — des Feuchtigkeitsgehaltes. 422
—, verschiedener Dünger, Wirkung auf Zuckerrüben. 155
Stiltonkäse s. Käse, Stilton-.
Streifenkrankheit der Gerste, Bekämpfung mit Kupfervitriol. 100
Streptococcus, Vorkommen in Eiern. 617
—, Alkali- und Säurebildung. 111
— lacticus, Vorkommen in Stilton-Käse. 146
— —, — im Yoghurt. 143
Streptokokken der Milch, Fermentation von Kohlehydraten. 134
Streptothrix, Vorkommen in Eiern. 617
Streptothrix odorifera, Vorkommen in Milch. 412
Strohdüngung, Wirkung auf leichte Böden. 153
Strychninhafer, Bekämpfungsversuche gegen Mäuse. 102
Sublimat, Bekämpfungsmittel gegen Fusarium nivale. 97
—, Bekämpfungsversuch gegen Weizensteinbrand. 90
— + Kupfervitriol, Bekämpfungsmittel gegen Weizensteinbrand. 90
—, Widerstandsfähigkeit von Hefe. 201
Sublimoform, Bekämpfungsversuch gegen Weizensteinbrand. 90

Taette, Bereitung. 144
Tannasegehalt von Aspergillus niger, Wirkung des Gerbsäuregehaltes der Nährlösung. 167
— — Penicillium rugulosum, Wirkung des Gerbsäuregehaltes der Nährlösung. 167
Tabakpflanze, Bibitkrankheit. 169
—, Gründüngung mit Desmodium stipulaceum und Crotaloria retusa. 169
—, Kräuselkrankheit durch Thrips. 169
—, Krupuk, Ursache. 169
—, Lanaskrankheit, Bekämpfung. 169
—, —, durch Phytophthora nicotianae. 169
—, Mosaikkrankheit, Infektionsversuche. 169
Tabakpflanze, Setzlinge, Bedeutung der Seitenwurzeln. 169
Tarsonemus calmicola, Vorkommen auf Quecke. 88
Terminalia, Vorkommen von Pycnocarpon magnificum. 639
Thiovulum majus n. gen. et n. sp., Schwefeleinschlüsse. 160
— minus, Schwefeleinschlüsse. 160
Thrips, Erreger der Kräuselkrankheit der Tabakpflanze. 169
Tiere, Leuchten, Zweckmäßigkeit. 112
Tilletia caries s. a. T. tritici.
— —, Verbreitung in Italien. 90
— laevis, gleichzeitiges Vorkommen mit T. tritici auf derselben Ähre. 90
— —, Verbreitung in Italien. 90
— tritici s. a. T. caries.
— —, gleichzeitiges Vorkommen mit T. laevis auf derselben Ähre. 90
Toluol, Wirkung auf den Bakteriengehalt des Bodens. 158
—, — — die Nitratbildung im Boden. 584
—, — — Protozoen. 158
Ton, Wirkung auf leichte Böden. 153
Torf, Wirkung auf Alkoholgärung. 126
Torula, Vorkommen im Stilton-Käse. 146
Torula-Arten, Abtötung durch hohe Temperaturen. 454
— —, Vorkommen in Cheddar-Käse. 449
Tradescantia discolor, Erfrieren, Bedeutung des Zuckergehaltes. 84
Trichoderma lignorum, Zellulosezerstörung. 167
Trichopeltaceae, Diagnose. 629
Trichopelteen, Entwicklung. 626
—, Unterschied von Microthyriaceen. 625
—, Vorkommen auf Knightia excelsa. 635
Trichopeltella, Diagnose. 632
— montana, Vorkommen auf Vaccinium teysmannianum. 632
Trichopeltina n. gen., Diagnose. 630
— chilensis, Vorkommen auf Eugenia. 631
— labecula, Vorkommen auf Azara serrata. 630
— —, — — Desfontainia. 630
Trichopeltis, Diagnose. 633
— ferruginea, Zugehörigkeit zu Flechten. 636
— —, synonym mit Trichopeltina labecula. 630
— montana, synonym mit Trichopeltella montana. 632
— oblecta, Zugehörigkeit zu Flechten. 636
— pulchella, Vorkommen auf Myrtaceen. 633
— (?) reptans, Vorkommen auf Piper. 634
Trichopeltula n. gen., Diagnose. 636
— hedycaryae n. gen. et n. sp., Vorkommen auf Hedycarya dentata. 636
Trichothyrium chilense synonym mit Trichopeltina chinensis. 631

Trichothyrium dubiosum, Vorkommen auf Clusia. 635. 636
— —, — — Piper. 636
Triticum compactum, Schädigung durch Puccinia triticina. 95
— durum, Widerstandsfähigkeit gegen Puccinia triticina. 95
Trockenheit, Schädigung von Getreide in bestimmten Entwicklungsstadien. 84
—, Wirkung auf die Ausbildung der Fruchtschale des Getreides. 83
Tyrosinase, Vorkommen in Disciotis perlata. 121
—, — — Gyromitra gigas. 121
Tyrothrix, Vorkommen im Stilton-Käse. 146

Umschlagen des Bieres, Verhütung. 129
Unkraut, Keimfähigkeitsdauer im Boden. 86
—, Keimungsbedingungen. 86
Unkrautsamengehalt des Bodens. 85
— — —, Nachweis, Methode. 86
Uredineen, Teleutosporen, Keimungsbedingungen. 93
Urin, Vorkommen von Bacillus acidi lactici. 142
Urobacillus leubei, Identität mit Bacillus probatus. 209
— pasteurii, Identität mit Bacillus probatus. 209
Ustilago jensenii, Mycelbildung, Ursache. 92

Vaccinium teysmannianum, Vorkommen von Trichopeltella montana. 632
Vibrio, Alkali- und Säurebildung. 111
— el-tor, Wirkung ultravioletter Strahlen. 191
Volutin, Vorkommen in Cladothrix dichotoma. 376

Wanzen, Schädlinge von Kartoffeln. 172
Wasser, Bedeutung für die Nitratbildung im Boden. 154
—, Brau-, biologische Untersuchung, Bedeutung der Konzentration der Würze. 130
—, fäkale Verunreinigung, Nachweis mit der Gärungsprobe. 75
—, Selbstreinigung, Bedeutung der Pflanzen. 188
—, — bei fließendem und stehendem. 189
—, Sterilisation mit ultravioletten Strahlen. 189
—, — durch ultraviolette Strahlen, Bedeutung der Durchsichtigkeit. 191
—, Trink-, Desinfektion mit Chlor, Wirkung organischer Substanzen. 192
—, —, Untersuchung auf Colibakterien. 175
—, —, —, Eijkmansche Methode. 75
—, Untersuchung, Bedeutung der Gasbildung von Bacterium coli. 178
Wasser, Untersuchung, Methodik. 174
—, Vorkommen von thermophilen Bakterien. 149
Weißtannenholz, Ursache der Rotfärbung von Käse. 147
Weizen, Flugbrand, Bekämpfung mit Heißwasser. 92
—, Flugbrandbefall, Beziehung zur Korngröße. 92
—, Keimfähigkeit, Wirkung von Cuprocorbin. 91
—, —, — — Formaldehyd. 90
—, —, — — Heißwasser. 90
—, —, — — Lysoform. 90
—, Schädigung durch Hadena basilinea. 88
—, — — Kaliumchloriddüngung. 82
—, — — Radium. 84
—, — — Säureanreicherung im Boden. 82
—, — — Stenothrips graminum. 100
—, — — Zinksalze. 85
—, Steinbrand, Auftreten, Bedeutung der Saatzeit. 91
—, —, Bekämpfung mit Cuprocorbin. 91
—, —, — — Formaldehyd. 90
—, —, — — Kupfervitriol. 90
—, —, — — Lysoform. 90
—, —, — — Sublimat + Kupfervitriol. 90
—, —, Bekämpfungsversuche mit Antiavit. 91
—, —, — — Antimycel. 91
—, —, — — Corbin. 91
—, —, — — Floriasaatenschutz. 91
—, —, — — Sublimat. 90
—, —, — — Sublimoform. 90
—, —, Deformierung der Ähren. 91
—, —, Überwinterung im Boden. 91
—, Widerstandsfähigkeit verschiedener Arten gegen Puccinia triticina. 95
—, — gegen Rost, Vererbbarkeit. 94
—, Winterfestigkeit, Vererbung. 85
Willia belgica, Verhalten gegenüber verschiedenen Zuckerarten. 202
Windhalm s. a. Apera spica venti.
—, Bekämpfung. 87
Winterfestigkeit des Weizens, Vererbung. 85
Wurzelkrümmungen, exzentrisches Dickenwachstum. 172
Wurzelpilze, Stickstoffassimilation. 170

Yoghurt, bakteriologische Untersuchung. 143
—, Bereitung und Anwendung. 143
—, Vorkommen von Bacillus bulgaricus. 143
—, — — Streptococcus lacticus. 143

Zellulose, Vergärung durch Bakterien. 502
—, Zersetzung, Bildung von Humussubstanzen. 168
—, Zerstörung durch Bakterien. 167
—, — — Pilze. 167

Zigarren, Vorkommen von Aspergillus fumigatus. 169
Zink, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
—, Wirkung auf das Wachstum von Aspergillus niger. 186
Zinkarsenat, Wirkung auf die Ammoniakbildung im Boden. 548
—, — — — Nitratbildung im Boden. 552
Zinkchlorid, Wirkung auf die Alkoholgärung. 124
Zinksalze, Schädigung von Getreide. 85
Zinkvitriol, Wirkung auf Bakterien. 121
—, — — Hefe. 121
Zinn, oligodynamische Wirkung auf Aspergillus niger. 490
Zitronensäuregärung s. Gärung, Zitronensäure-.
Zucker, Schutzwirkung gegen Erfrieren der Pflanzen. 84
Zucker, Vergärung durch Bakterien, Wirkung von Malachitgrün und Brillantgrün. 398. 402
—, Verhalten von Mycoderma lambica. 202
—, — — Mycoderma vanlaeriana. 202
—, — — Saccharomyces bruxellensis. 202
—, — — Willia belgica. 202
—, Wirkung auf Stickstoffumsetzung im Boden. 435
—, Zitronensäuregärung. 164
Zuckerrübe, Schädigung durch Nematoden. 81
—, Wirkung verschiedener Stickstoffdünger. 155
Zymase, Wirkung von Chemikalien. 122
—, Unterschied von Karboxylase. 125
Zymonema, Zugehörigkeit zu Mycoderma. 125

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Actinomyces albus. 566
— odorifer. 581
— S. a. 572
Ammoniak, Bestimmung, Apparat. 283
Apparat zur Ammoniakbestimmung. 283
Aspergillus niger, Entwicklung unter dem Einfluß verschiedener Metalle. 489—491
Asterina reptans (Fig. 4; Taf. I, Fig. 4, 6). 627. 640
Bacillus aurogenus (Taf. I, Fig. 1). 522
— caesius (Taf. I, Fig. 2). 522
— cytaseus var. zonalis (Taf. II, Fig. 5, 6). 523
— gelidus (Taf. I, Fig. 4). 522
— probatus (Taf. I u. II). 358
— —, Sporengröße, Variationskurve. 227
— —, — auf verschiedenen Nährböden, Variationskurven. 320. 321. 353
— rossicus var. castaneus (Taf. I, Fig. 3). 522
Boden, Nitratbildung, Wirkung von Schwefelkohlenstoff und Toluol (Kurven). 589
Brefeldiella brasiliensis (Fig. 1, 3; Taf. I, Fig. 8). 626. 627. 640
— subcuticulosa. 638
Cladothrix dichotoma, Fäden (Fig. 1, 3, 7). 376. 382. 385
— —, Fett und Volutin (Fig. 2). 378
— —, Schwärmer (Fig. 6). 384
— —, Verzweigung (Fig. 4, 5). 382. 383
Fusariumkonidien von Obstbaumkrebs. 660
Harnstoffspaltung (Kurven). 336. 337
Hefe, schwarze, Hyphen mit Konidien Fig. 2—4, 6). 4. 5. 6
Hefe, schwarze, Kolonie (Fig. 5). 6
—, —, Luftmycel (Fig. 13—14). 15—18
—, —, Riesenkolonien (Taf. I, Fig. 1—6). 14
—, —, Sproßzellen (Fig. 1, 7—12). 4. 6. 7. 8. 15
Kartoffel, Triebe mit Phytophthora infiziert. 485. 486
Obstbaumkrebs, Wunden. 650. 651
Pseudomonas effusa (Taf. II, Fig. 7). 523
— perlurida (Taf. II, Fig. 8). 523
— tralucida (Taf. II, Fig. 9). 523
Pycnocarpon magnificum (Fig. 7; Taf. I, Fig. 5, 7). 640
Saccharomyces anamensis, Gärung (Kurven). 44. 45
— —, Riesenkolonien (Fig. 8—15). 37
— —, Sporen (Fig. 1, 2). 27. 29
— —, Sporenbildung bei verschiedenen Temperaturen (Kurven). 30
— —, verschiedene Zellformen (Fig. 3—7, 16—18). 32. 35. 36. 38. 39
— zopfii (Fig. 1—5). 471. 474. 475
Schwefelbakterien (Fig. 1—5). 442—444
Torula aus Cheddarkäse (Taf. I—III). 454
Trichopeltella montana (Taf. I, Fig. 1). 640
Trichopeltina chilensis (Fig. 5). 632
Trichopeltis pulchella (Fig. 2). 626
— reptans (Taf. I, Fig. 2). 640
Trichopeltula hedycaryae (Taf. I, Fig. 3). 640
Tropfenzähler. 267

IV. Neue Literatur.

362. 447.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

AN INITIAL FINE OF 25 CENTS
WILL BE ASSESSED FOR FAILURE TO RETURN THIS BOOK ON THE DATE DUE. THE PENALTY WILL INCREASE TO 50 CENTS ON THE FOURTH DAY AND TO $1.00 ON THE SEVENTH DAY OVERDUE.

Book Slip—10m-8,'51(6813s4)458

81924
Zen. f. bakt.

QR1
Z4
Abt.2
v.39

81924